

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ ANILAZINU NA STŘÍBRNÉ TUHÉ AMALGÁMOVÉ ELEKTRODĚ

VOLTAMMETRIC DETERMINATION OF ANILAZINE ON
SILVER SOLID AMALGAM ELECTRODE

Diplomová práce

Studijního oboru Chemie životního prostředí

Praha 2012

Martin BYSTRIANSKÝ

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně, pod vedením RNDr. Jana Fischera, Ph.D., a že jsem všechny použité prameny řádně citoval.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 8. Května 2012

.....

podpis

Poděkování

Touto cestou bych chtěl poděkovat svému školiteli RNDr. Janu Fischerovi, Ph.D. za nabídnuté téma, odborné vedení práce a cenné rady, které mi pomohly proniknout hlouběji do tajů elektrochemie ať už během experimentů, nebo při psaní práce.

Dále děkuji členům Katedry analytické chemie za vytvoření příjemného pracovního prostředí v laboratořích a za pomoc, které se mi dostalo.

Také děkuji své rodině za podporu a pochopení během studia i tvorby této diplomové práce.

Tato diplomová práce byla finančně podporována MŠMT ČR (MSM 0021620857; ME10004), GAČR (projekt P 206/10/P087) a TAČR (projekt TA01020565).

Abstrakt

Anilazin (4,6-dichloro-N-(2-chlorofenyl)-1,3,5-triazin-2-amin) je fungicid ze skupiny triazinových pesticidů. Tyto pesticidy byly velmi používané, avšak jsou toxické zejména pro vodní organismy, proto se jejich používání omezuje. Anilazin již není zařazen mezi povolené přípravky v Evropské unii, stále však je možné detekovat v environmentálních vzorcích stopy jeho reziduí.

V této práci je zkoumána možnost stanovení anilazinu pomocí stříbrné pevné amalgámové elektrody modifikované rtuťovým meniskem (m-AgSAE). Bylo využito metody diferenční pulsní voltametrie. Pro stanovení je důležité kyselé pH (v práci bylo pracováno v prostředí Brittonova-Robinsonova pufru o $\text{pH} = 2$), neboť elektrochemická redukce anilazinu (i dalších triazinových pesticidů) začíná protonizací heterocyklického kruhu. Anilazin poskytuje při $\text{pH} = 2$ jeden pík, jehož potenciál $E_p = -827 \text{ mV}$ (oproti $3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ argentochloridové elektrodě). Pracovní elektroda byla regenerována elektrochemicky při potenciálech $E_{\text{in}} = -1100 \text{ mV}$ a $E_{\text{fin}} = +50 \text{ mV}$.

Pomocí DPV bylo dosaženo limitu stanovitelnosti v říční vodě $L_Q = 2,0 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Dále byly ověřeny dva různé způsoby snížení limitu stanovitelnosti: adsorpční rozpouštěcí voltametrie (AdSV) a prekoncentrace tuhou fází (SPE).

Pomocí AdSV bylo dosaženo limitu stanovitelnosti $L_Q = 0,5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Podmínky adsorpce byly $E_{\text{acc}} = -100 \text{ mV}$, $t_{\text{acc}} = 60 \text{ s}$.

SPE byla prováděna na 200mg kolonkách Lichrolut RP-18, objem vzorku činil 100 ml, eluce byla provedena 1 ml methanolu. Po doplnění eluátu puforem do 10 ml roztoku byly proměřeny voltametrické křivky. Bylo dosaženo limitu stanovitelnosti $L_Q = 0,2 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Klíčová slova: triazinové pesticidy, anilazin, diferenční pulsní voltametrie, stříbrná tuhá amalgámová elektroda

Abstract

Anilazine (4,6-dichloro-N-(2-chlorophenyl)-1,3,5-triazin-2-amine) is a fungicide from a group of triazine pesticides. These have been very widely used but for their toxicity for water environment they are being cancelled. Use of anilazine is not allowed anymore in the European Union. However, traces of its residues are able to find in environmental samples.

The diploma thesis deals with determination of anilazine using silver solid amalgam electrode modified by mercury meniscus (m-AgSAE). Differential pulse voltammetry was used. For the determination, an acidic solution is necessary. In the work Britton-Roninson buffer pH = 2 was used. This is because of electrochemical reduction of anilazine (and other triazines) which is started by protonization of heterocycle ring. Anilazine exhibits one single well-defined peak, the potential of the peak was about $E_p = -827$ mV (vs. $3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ argentochloride electrode). The limit of quantification achieved in surface water was $2 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Other two possibilities of getting lower limit of quantification were examined – Adsorptive Stripping Voltammetry (AdSV) and preconcentration by Solid Phase Extraction (SPE).

Using AdSV the limit of quantification $L_Q = 0,5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Conditions of adsorption were as following: $E_{acc} = -100$ mV, $t_{acc} = 60$ s.

For SPE, 200-mg columns Lichrolut RP-18 were used. Volume of extracted solution was 100 ml, the elution was carried with 1 ml of methanol. After filling the eluate by buffer to 10 ml of solution DP voltamograms were carried out, the limit of quantification achieved was $L_Q = 0,2 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Keywords: triazine pesticides, anilazine, differential pulse voltammetry, silver solid amalgam electrode

Obsah

1	Úvod	8
1.1	Cíl práce	9
1.2	Studovaná látka	9
2	Teoretická část	10
2.1	Triazinové pesticidy	10
2.2	Anilazin	11
2.3	Fyzikálně-chemické vlastnosti anilazinu	13
2.4	Biologické účinky anilazinu	13
2.5	Analytické metody stanovení anilazinu	14
2.6	Elektrochemické stanovení triazinů	16
2.7	Elektrochemické chování anilazinu	17
2.8	Amalgámové elektrody	18
3	Experimentální část	20
3.1	Reagencie	20
3.2	Aparatura	21
3.3	Pracovní elektroda	22
3.4	Stálost roztoku anilazinu	23
3.5	Pracovní postupy	25
3.5.1	Diferenční pulsní voltametrie	25
3.5.2	Adsorpční rozpouštěcí voltametrie	25
3.5.3	Vyhodnocování naměřených křivek	26
3.5.4	Určení limitu stanovitelnosti	26
3.5.5	Prekoncentrace tuhou fází	26
4	Výsledky a diskuze	27
4.1	Diferenční pulsní voltametrie anilazinu	27
4.1.1	Vliv pH	27
4.1.2	Opakovatelnost měření	29
4.1.3	Koncentrační závislost	31
4.2	Adsorpční rozpouštěcí voltametrie	38
4.3	Prekoncentrace tuhou fází (SPE)	42
5	Závěr	46
6	Seznam použité literatury	48

Seznam zkratk a symbolů

AdSV	Adsorpční rozpouštěcí voltametrie
m-AgSAE	Rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná tuhá amalgámová elektroda
DME	Kapající rtuťová elektroda
DPV	Diferenční pulsní voltametrie
E_{acc}	Potenciál akumulace
EC ₅₀	Efektivní koncentrace, která ovlivní 50 % populace
ECD	Detektor elektronového záchytu
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
E_{in}	Vstupní potenciál
E_{fin}	Konečný potenciál
E_p	Potenciál píku
GC	Plynová chromatografie
HMDE	Visící rtuťová kapková elektroda
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
I_p	Proud píku
LC ₅₀	Koncentrace, která způsobí úhyn 50 % populace
LC-MS	Kapalinová chromatografie s hmotnostním detektorem
LD ₅₀	Dávka, která způsobí úhyn 50 % populace
LOD	Limit detekce
L _Q	Limit stanovitelnosti
MeOH	Methanol
NOAEL	Koncentrace, při které ještě nebyly pozorovány nežádoucí účinky
SCE	Nasycená kalomelová elektroda
SPE	Prekoncentrace tuhou fází
t_{acc}	Doba akumulace

1 Úvod

Pesticidy jsou látky chránící zemědělské plodiny nebo průmyslové plochy před napadením hmyzem, plísněmi, plevelem a jinými škůdci. Jejich použití je prakticky nevyhnutelné, kvůli tlaku na kvalitu i na množství produkováných plodin. Některé pesticidy však působí toxicky nejen proti cílovým organismům, ale také proti dalším organismům, které jsou v dané oblasti přítomné, ba i žádoucí. Řada skupin pesticidů je navíc persistentních a tak lze jejich přítomnost v některých oblastech zjistit i po několika letech, kdy se již v dané oblasti nepoužívají. Dalším nežádoucím jevem je jejich možná mobilita, která může zapříčinit kontaminaci okolních, vůči těmto kontaminantům citlivých, ekosystémů jako jsou například vodní toky.

Používání těchto přípravků je z hlediska produkce potravin nutné, legislativními předpisy jsou však postupně omezovány a zakazovány ty pesticidy, jejichž používání s sebou přináší velká rizika. Mezi tyto látky patří také triazinové pesticidy. Anilazin je fungicid ze skupiny triazinových pesticidů, jehož používání již není v EU povoleno. Stále je však možno nalézat rezidua anilazinu nebo jeho produktů degradace.

Tato diplomová práce se zabývá voltametrickým chováním anilazinu na stříbrné tuhé amalgámové elektrodě. Voltametrické metody jsou vhodnou metodou ke stanovení oxidovatelných nebo redukovatelných látek, mezi něž patří i triaziny. Amalgámové elektrody pak mohou úspěšně nahradit klasickou rtuťovou kapající elektrodu, jež vyžaduje práci s kapalnou rtutí. Naopak amalgámové elektrody jsou pevné, netoxické a robustní, navíc je možno jich použít i při práci v terénu.

1.1 Cíl práce

V této diplomové práci byl anilazin stanovován pomocí diferenční pulsní voltametrie (DPV) na meniskem modifikované stříbrné tuhé amalgámové elektrodě (m-AgSAE). Cílem práce bylo nalézt optimální podmínky pro stanovení a zjistit tvar koncentračních závislostí, meze stanovitelnosti a ověřit možnost stanovení této látky v říční vodě. Dále byly ověřovány možnosti prekoncentrace stanovované látky.

1.2 Studovaná látka

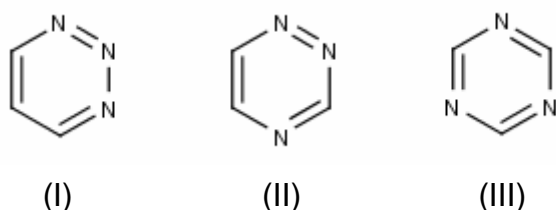
Anilazin, 4,6-dichloro-N-(2-chlorofenyl)-1,3,5-triazin-2-amin, je fungicid ze skupiny triazinových pesticidů. Uplatnil se proti plísním jako je plíseň sněžná napadající trávníky a okrasné plochy, ale také při ochraně zeleniny. Jeho používání je již zakázáno. Je toxický vůči vodním organismům, pro savce a člověka nevykazuje akutní toxicitu.

2 Teoretická část

2.1 Triazinové pesticidy

Triaziny jsou zejména perzistentní půdní herbicidy. Při aplikaci ve větších koncentracích ($5 - 20 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$) působí jako totální herbicidy použitelné na průmyslových prostranstvích, avšak v menších koncentracích ($1 - 4 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$) jimi lze selektivně hubit plevel v hospodářských plodinách.¹ Triaziny jsou inhibitory fotosyntézy, kde blokují přenos elektronu. Postižená rostlina postupně odumírá.^{2,3} Kromě herbicidů se cyromazin používá jako insekticid a anilazin je fungicid. Mechanismus jeho působení není zcela znám.^{2,4}

Triaziny jsou dusíkaté heterocyklické sloučeniny. Existují tři skupiny triazinů podle polohy atomů dusíku v aromatickém jádře, jak je zobrazeno na Obr. 1.



Obr. 1

Struktura triazinů: Vicinální (1,2,3-triaziny) (I), asymetrické (1,2,4-triaziny) (II) a symetrické (s-triaziny, 1,3,5-triaziny) (III).

Největší využití mají s-triaziny, které mohou být použity jako aktivní složky pesticidů, ale také se používají při výrobě azobarviv nebo pryskyřic (to je případ melaminu, triazinu substituovaného třemi amino skupinami). Symetrické triaziny jsou syntetizovány trimerizací chlorkyanu nebo kyanimidu s následnou substitucí na aromatickém jádře.^{5,6} Konkrétně anilazin byl vyráběn reakcí kyanurylchloridu s 2-chloroanilinem v přítomnosti uhličitanu sodného.⁷ Chemické, fyzikálně-chemické i biologické vlastnosti triazinů jsou dány povahou substituentů na uhlících v cyklu. Mezi nejčastější substituenty patří chlor. Jednotlivé substituenty ovlivňují rozpustnost sloučeniny ve vodě, která se pohybuje v rozmezí 5-750 ppm ($-\text{OCH}_3 > -\text{SCH}_3 > -\text{Cl}$).⁸ Název triazinů podle skupiny je odvozen od substituentu v pozici 2. Je-li tímto substituentem atom chloru, pak název celé látky je zakončen

koncovkou -azin, v případě methylthiové skupiny se jedná o -etryn a v případě methoxy skupiny je název zakončen na koncovku -ton. (Tab. 1).

Tab. 1

Příklady substituentů triazinů⁹

Název	Pozice substituentu		
	2	4	6
Anilazin	Cl	Cl	NHC ₆ H ₄ Cl (ar.)
Atrazin	Cl	NHC ₂ H ₅	NHC ₃ H ₇ (iso)
Chlorazin	Cl	N(C ₂ H ₅) ₂	N(C ₂ H ₅) ₂
Prometryn	SCH ₃	NHC ₃ H ₇ (iso)	NHC ₃ H ₇ (iso)
Prometon	OCH ₃	NHC ₃ H ₇ (iso)	NHC ₃ H ₇ (iso)

2.2 Anilazin

Anilazin se používal jako fungicid pro ochranu travníků před plísní sněžnou, ale také obilovin a zeleniny, zejména proti skvrnitosti listů brambor a rajčat.^{10, 11} Ve starší literatuře a v komerční sféře býval také označován názvem Dyrene. Pod tímto názvem se používal od roku 1957.¹² Nyní je již jeho používání zakázáno, neboť jeho registrace v ČR (a EU) byla ukončena v roce 1993 směrnicí Evropské rady 91/414/EHS a nařízením komise (ES) č. 2076/2002.^{13, 14} Anilazin je veden v seznamu klasifikovaných nebezpečných látek.¹⁵ Jelikož v životním prostředí lze stále zjistit přítomnost pesticidů, které se již nepoužívají, i tyto jsou sledovány a to podle nařízení komise (ES) č. 149/2008, které stanovuje limity koncentrací reziduí již nepoužívaných pesticidů v životním prostředí.^{16,17} Mimoto lze na českých zahrádkářských serverech stále nalézt rady pro používání anilazinu, ačkoliv se jedná o nepovolený přípravek.¹⁸ Zde je otázkou, zda se jedná o nevědomost či cílenou netoleranci nařízení, například z důvodů přebytečných zásob starých pesticidů.

Anilazin je kontaktní širokospektrý fungicid, používaný pro prevenci rostlin před napadením houbami a plísněmi. Přesný mechanismus působení zatím není prozkoumaný. Jedná se o nesystematický pesticid, který působí jako inhibitor enzymů s několika cílovými místy v houbě.^{19, 20, 21}

V České republice byl anilazin používán zejména k ošetření travníků před plísňí sněžnou, která po roztátí sněhové pokrývky tvoří povlak na rostlinách, jež následně odumírají.²²

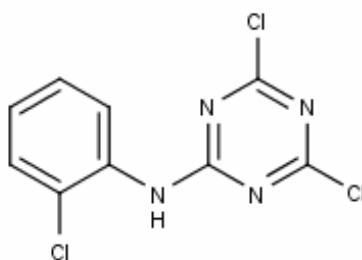
Výrobce byl anilazin určen k ochraně následujících plodin: celeru, cibule, jahod, okurek, tykví, brambor, rajčat, okrasných travníků a mečíků.²⁰ Byl dodáván jako rozpustný prášek nebo granule.¹² Poprvé byl vyroben v roce 1955 jako první z anilidů a původně se měl používat jako herbicid, poté však byly zjištěny jeho fungicidní účinky.^{21, 23} Některé odrůdy kukuřice a cukrové třtiny jsou vůči triazinům rezistentní. Obsahují totiž enzym, který způsobuje hydrolýzu triazinů, čímž rostlinu detoxifikuje. Vznikající produkty již nejsou herbicidní, čehož lze využít k ochraně uvedených plodin před zaplevelením.²⁴

Anilazin je látka obsahující ve své struktuře dva aromatické cykly, čímž dochází k sorpci na organickou hmotu v půdě. Tím je také dána jeho velmi nízká mobilita v půdě. Při pokusech s radioaktivně značenou sloučeninou bylo zjištěno, že i po několika letech zůstává více než 80% radioaktivity v místě aplikace v horní orné vrstvě půdy. Dále bylo až 15% reziduí vázáno na fulvokyseliny přítomné v půdě. Jelikož fulvokyseliny jsou hlavní organickou složkou půdy, jež je rozpustná ve vodě, pak rezidua na ně vázané jsou biologicky dostupná rostlinám i půdní fauně.²⁵ Samotný anilazin se však ve vlhké i suché půdě rychle rozpadá. Poločas života anilazinu v půdě je asi 2 dny.¹⁹ Hlavními metabolity vznikajícími z anilazinu v půdě jsou hydroxyanilazin a dihydroxyanilazin, dále mohou vznikat dimethoxyanilazin a N-methyl-dimethoxyanilazin. Tyto metabolity dále zůstávají sorbované v půdě.^{25, 26} Anilazin je reaktivní, může podléhat zejména nukleofilní substituci, při které jsou nahrazeny atomy chloru z triazinového cyklu, dále může reagovat dusík z aminoskupiny. Vazba na organickou hmotu půdy a sedimentů je dána etherovými můstky a dalšími atomy kyslíku (fenoly, estery), možné jsou i iontové interakce.^{19, 26, 27}

2.3 Fyzikálně-chemické vlastnosti anilazinu

Anilazin je bílý prášek, obtížně rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v methanolu. Je velmi toxický pro vodní organismy.

C.A.S. název:	Anilazine
C.A.S. registrační číslo:	101-05-3
Chemický název:	4,6-dichloro-N-(2-chlorofenyl)-1,3,5-triazin-2-amin
Sumární vzorec:	C ₉ H ₅ Cl ₃ N ₄
Strukturní vzorec:	



Vybrané fyzikálně-chemické vlastnosti anilazinu²⁸

Molekulová hmotnost:	275,52 g·mol ⁻¹
Disociační konstanta:	pK _A = 4,6
Lipofilita:	log K _{ow} = 3,02
Teplota tání	159 – 160 °C
Tenze par:	za normální teploty zanedbatelná

2.4 Biologické účinky anilazinu

Účinky anilazinu a dalších triazinových pesticidů na živé organismy byly popsány v dřívějších studiích.^{2,10, 29,}

Anilazin není příliš toxický pro člověka ani savce, způsobuje však podráždění kůže a očí.^{11,30} Je na seznamu nejčastějších látek, které způsobovaly kožní obtíže spojené s používáním pesticidů.³¹ K tomu však dochází až po dlouhodobé expozici, akutní toxicita není příliš vysoká. Vzhledem k nízké tenzi par jsou zdravotní rizika způsobená inhalací nízká.³² Jedná se však o látku, která působí velmi toxicky ve vodním prostředí na ryby a bezobratlé organismy.^{12, 29, 33,}

Při studii toxicity anilazinu na zvířata bylo zjištěno, že mezi hlavní příznaky otravy anilazinem patří průjem a zvracení, při kontaktu s kůží dojde podráždění jako otok a erytém. Anilazin je nejtoxičtější při intraperitoneálním podání, jiné cesty vstupu omezuje jeho nízká kožní i enterální absorpce.

Při studiích metabolismu, kde byly použity radioaktivně značené sloučeniny, bylo zjištěno, že většina radioaktivity je vyloučena stolicí, částečně též močí. Avšak výchozí látka v nich nebyla prokázána, byly přítomny pouze její metabolity. Hlavním metabolitem byl 2-(2-chloroanilino)-s-triazinedione, který byl přítomen pouze v moči. Dále byl anilazin konjugován na glutathion. Akumulace v některém z orgánů nebyla pozorována.

Během dlouhodobých testů nebyla zjištěna karcinogenita ani mutagenita. Při vysokých dávkách $>100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ byla zjištěna snížená plodnost. Alergická reakce na anilazin byla popsána u pracovníků farmy, kteří byli vystaveni třem pesticidům (kromě anilazinu to byl benomyl a endosulfan) a s podrážděním kůže museli vyhledat zdravotní ošetření.³¹

Hodnota NOAEL (No Observable Averse Effect Limit, Nejvyšší koncentrace, při které se ještě neprojevily nepříznivé účinky) se pro různé druhy pohybovala mezi 10 a $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Akceptovatelný denní příjem pro člověka byl stanoven na $<0,1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. LD_{50} pro potkany orálně je $2700 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, LD_{50} pro králíky vstupem přes kůži je $9400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. (Cit. ³⁴) LC_{50} pro ryby (48 hodin) je $0,221 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, EC_{50} pro korýše (48 hodin) je $1,02 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. (Cit. ³⁵)

Osud anilazinu v lidském organismu byl sledován ve studii³⁶ během 7 let (1988 – 1995) na téměř 500 pracovnících, kteří přicházeli do styku s kyanurylchloridem a anilazinem. Anilazin v organismu podléhá rychlé konverzi probíhající na atomu chloru. Anilazin tvoří adukty s endogenními proteiny, v moči byly stanoveny merkapturové kyseliny, v krvi byly přítomny adukty se sérovým albuminem. Indukční doba zvýšení citlivosti se pohybovala v průměru okolo 5 let.

2.5 Analytické metody stanovení anilazinu

Krátce po zavedení anilazinu na trh byly zkoumány nové možnosti jeho stanovení. Podstatou kolorimetrického stanovení je diazotační a kopulační reakce N-1-naftylethylendiaminu s produktem kyselé hydrolýzy anilazinu, o-chloroanilinem. Vzniká barvivo, jež je stanovené spektrofotometricky při 540 nm.

Touto metodou byla stanovována rezidua anilazinu v zelenině a bylo dosaženo limitu detekce 1,0 ppm.³⁷ Další metoda spektrofotometrického stanovení je Zinckeho reakce s pyridinem, kterou byly stanovovány chlorované pesticidy. Po extrakci anilazinu acetonem z jablek bylo dosaženo limitu 0,05 ppm.³⁸ Titrační metoda byla založená na stanovení chloridových iontů uvolněných z anilazinu po rozkladu hydroxidem sodným. Tato metoda se používala zejména pro určení čistoty technického anilazinu.⁷

Pro stanovení anilazinu (a dalších pesticidů) byla ve studii ³⁹ použita nízkoteplotní fosforimetrie. Limit detekce pro anilazin byl 0,006 ppm. Anilazin má charakteristickou fosforescenci, excitační maximum je při 276 nm a emisní maximum při 412 nm.

V současné době jsou pesticidy stanovovány hlavně chromatografickými metodami, v případě těkavějších pesticidů plynovou chromatografií a v případě tepelně labilních pesticidů vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. Jako detektory jsou využity spektrofotometrické a hmotnostní detektory.^{40, 41, 42} Ačkoli jsou tyto metody velmi citlivé, jejich nevýhodou je časově a materiálově náročná extrakce a příprava vzorku.

Těmito metodami lze detekovat nanogramová množství pesticidů. Pro dosažení ještě nižších limitů detekce lze zařadit prekoncentrační stupeň.^{8,43} Vysoké citlivosti bylo s úspěchem dosaženo také pomocí detektoru elektronového záchytu (ECD), jelikož pesticidy ve své struktuře obsahují dostatek atomů dusíku a chloru.⁴⁴ Další možností je metoda atomové emise, která byla použita v práci⁴⁵. Extrakty z potravin s 385 pesticidy byly separovány pomocí GC s detektorem atomové emise (AED), kterým byl stanoven obsah heteroatomů jako je N, Cl, P, S, Br, F. V případě anilazinu byl signál zajištěn dusíkem a chlorem. LOD dosáhl 0,01 ppm.

V přehledu dříve používaných metod ⁴⁶ je u anilazinu uvedeno porovnání HPLC na C8 koloně a GC s ECD, limity detekce nejsou uvedeny. Stejně detektory byly použity i ve studii ⁴⁷. Zde byly navrženy metody screeningu v zemědělských produktech. Screening spočíval v gelové permeační chromatografii následované plynovou chromatografií a 2 zmíněnými typy detektoru, přičemž MS detektor byl zařazen pro potvrzení výsledků získaných s ECD, hodnota LOD byla 0,003 ppm.

Ve studii ⁴³ bylo 128 pesticidů extrahováno z vody pomocí SPE a stanoveno systémem LC-MS s ionizací termosprejem. Limit detekce byl mezi 10 a 100 ppt. Extrakce anilazinu acetonitrilem a hexanem z rostlinného materiálu a následně

stanovení pomocí GC se 2 různými detektory – ECD a mikrocoulometrickým – je popsána v práci ⁴². Limit detekce je 5 – 20 ppm.

2.6 Elektrochemické stanovení triazinů

Při výběru metody, která bude použita pro analýzu pesticidů v environmentálních vzorcích, hraje roli kromě citlivosti metody také její selektivita, přesnost a správnost. Důležitým faktorem je také možnost a jednoduchost předúpravy vzorků a rychlost analýzy. Všechny z uvedených požadavků elektrochemické metody dostatečně splňují. Z elektrochemických metod se pro analýzu pesticidů používají zejména voltametrie a ampérometrie. Problémem však někdy může být nutnost extrakce pesticidů organickými rozpouštědly. Na druhou stranu lze někdy použít elektrochemické metody přímo v neupraveném nehomogenním vzorku, jelikož limitní difúzní proud nebývá příliš ovlivněn nerozpuštěnými nebo koloidními částicemi.⁴⁸

Jelikož velké množství organických látek, které se používají jako pesticidy obsahuje ve své struktuře elektroaktivní skupiny, lze pro jejich zkoumání použít voltametrickou analýzu. Elektrochemické metody jsou velmi užitečné pro objasnění mechanismů oxidace a redukce pesticidů. Dále v kombinaci se spektrometrickými studiemi mohou pomoci popsat degradační dráhy pesticidů a tím podat užitečné informace o osudu těchto látek v životním prostředí.⁴⁹

Triazinové pesticidy podléhají zejména katodické redukci. Obecně jsou s-triaziny redukovány pouze v kyselém prostředí, kde dochází k protonizaci cyklu, a vzrůstající pH se projeví na poklesu proudové odezvy.⁵⁰ Ovšem při pH nižším než je pK_a daného triazinu může docházet k odštěpení postranních řetězců nebo k otevření kruhu.^{48, 51} Redukce triazinů je popsána ve studii ⁵², ze které vycházejí i další studie (cit. ^{53,54}) stanovením triazinů na rtuťových elektrodách.

V těchto studiích byla potvrzena dobrá citlivost voltametrických metod, když limity detekce triazinových pesticidů na statické rtuťové kapkové elektrodě se pohybovaly okolo $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pro tast polarografii, $2 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pro DPV a na visící rtuťové kapkové elektrodě bylo dosaženo $1 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pro DPV a $2 \cdot 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pro AdSV. Tyto výsledky umožňují srovnání elektrochemických metod s metodami chromatografickými.⁵²

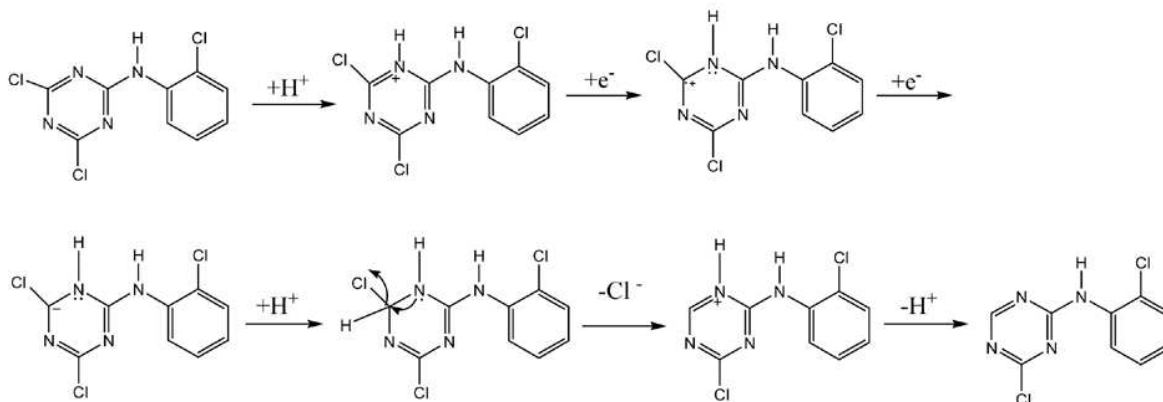
Ve studii ⁵⁵ byl pro detekci 5 triazinových pesticidů (kromě anilazinu ještě byly stanovovány simazin, atrazin, cyanazin a propazin) použit elektrochemický

detektor pracující v módu square-wave voltametrie. Triaziny byly rozděleny pomocí HPLC s reverzní fází. Pík anilazinu se vyskytoval při -710 mV oproti argentochloridové elektrodě. Limit detekce anilazinu byl $0,71$ ng.

Ve studii ⁵⁶ byla popsána oxidace s-triazinů na platinové elektrodě v bezvodém acetonitrilu. Půlvinové potenciály triazinů se pohybovaly od $1,8$ do $2,1$ V oproti kalomelové elektrodě (SCE).

2.7 Elektrochemické chování anilazinu

Anilazin stejně jako další triaziny podléhá elektrochemické redukci. Jeho chování na rtuťové kapkající elektrodě bylo popsáno ve studii ⁵⁷. Mezi nalezené podmínky pro stanovení patří pH zkoumaného roztoku $\text{pH} = 2$, dosažený limit detekce pak v tomto prostředí činí $0,128 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Pík anilazinu byl pozorován při $E_p = -795$ mV oproti SCE. Tento pík se vyskytoval v kyselém prostředí, kde se anilazin vyskytuje v protonizované formě. Bylo zjištěno, že redukce anilazinu je ireverzibilní. Byl navržen průběh redukce: začíná protonizací triazinového cyklu, po přijetí 2 elektronů vzniká nestabilní intermediát, který se stabilizuje uvolněním molekuly HCl (Obr. 2):



Obr. 2

Schéma elektrochemické redukce anilazinu ⁵⁷

Kromě koncentrační závislosti byly v této studii zkoumány také interakce s ionty těžkých kovů, které se mohou vyskytovat v environmentálních vzorcích. Bylo zjištěno, že ionty Cr^{3+} a Cd^{2+} poskytují pík při stejném potenciálu jako anilazin, avšak této interferenci se lze vyhnout například komplexací uvedených kovů pomocí EDTA. Dále bylo zjištěno, že anilazin nelze stanovit vedle pesticidu pyridaphentionu, neboť se jejich píky překrývají.

2.8 Amalgámové elektrody

Po dlouhou dobu byly ve voltametii používány zejména rtuťové kapkové elektrody, z nichž hlavní místo zaujímala rtuťová kapající elektroda (DME), která byla později převedena do formy statické rtuťové kapkové elektrody (SMDE) a visící rtuťové kapkové elektrody (HMDE). Na těchto elektrodách byly postupně vyvíjeny nové citlivější metody (DPV, AdSV, square wave voltametrie, tast voltametrie).^{58, 59}

Přehled používaných technik na různých elektrodách je uveden mimo jiné v přehledové práci⁴⁹.

Rtuťové elektrody prokázaly své kvality, které vyplývají zejména z kvality povrchu a jeho obnovy, díky čemuž mohou být tyto elektrody využity v řadě aplikací. Hlavními nevýhodami DME jsou spotřeba rtuti a vyšší nabíjecí proud, tyto však lze eliminovat použitím HMDE. Se rtuťovými elektrodami také nelze pracovat při kladných potenciálech kvůli oxidativnímu rozpouštění rtuti a je tedy nutné použít elektrody nertuťové, například z ušlechtilých kovů nebo uhlíkové elektrody. Jejich problémem je však nízké přepětí vodíku a nedostatečná regenerace povrchu elektrody. Nabízí se tak mezičlánek mezi oběma typy elektrod, totiž elektrody amalgámové, vytvořené z kompaktních kovů pokrytých vrstvou rtuti (Ag/Hg, Au/Hg, Cu/Hg...). Tento typ elektrod má vysoké přepětí vodíku a umožňuje pohodlnou práci stejně jako s pevnými elektrodami, regenerace jejich povrchu se většinou provádí elektrochemickou cestou. Amalgámové elektrody se mohou používat v různých modifikacích, jako jsou elektrody leštěné, filmové, meniskové, pastové nebo kompozitní. Stříbro je jedním z nejpoužívanějších materiálů pro výrobu elektrod, zvláště pokrytých filmem nebo meniskem rtuti. Stříbro rozpouštěné ve rtuti prakticky netvoří intermetalické sloučeniny s jinými kovy.^{60, 61}

Na amalgámových elektrodách lze redukovat prakticky veškeré skupiny látek jako jsou kationy těžkých kovů, aniony nebo organické látky.

V rámci projektů na katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze bylo stříbrných tuhých amalgámových elektrod využito ke stanovení biologicky aktivních látek jako jsou léčiva, karcinogenní a genotoxické sloučeniny nebo pesticidy. Výběr z publikovaných prací je zobrazen níže

Analyt	Metoda	LOD [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	Citace
3-nitrofluoranthren,	DPV, AdSV	0,03	62
pendimethalin	DPV	0,3	62
Bifenox	DPV	0,24	63
N,N-dimethyl-4-amino- 2'-carboxyazobenzene	DPV	1,17	64
5-nitrochinolin, 6-nitrochinolin	DPV	0,3	65

3 Experimentální část

3.1 Reagencie

Zásobní roztok anilazinu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním přesně naváženého množství 0,00689 g látky (99 %, Fluka) v methanolu. Zásobní roztok byl uchováván ve tmě při laboratorní teplotě. Roztoky o nižší koncentraci byly připravovány přesným ředěním zásobního roztoku zvoleným elektrolytem. Pracovní roztoky byly ihned (během několika hodin) použity.

Britton-Robinsonovy tlumivé roztoky (BR) o zvoleném pH byly připraveny smísením složky obsahující kyselinu boritou, kyselinu fosforečnou a kyselinu octovou, všechny o koncentraci $0,04 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, s $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaOH.

Použité chemikálie methanol (výrobce Lachema), hydroxid sodný (Penta), chlorid draselný (Lachner), kyselina boritá (Penta) byly čistoty p.a., dále byly použity kyselina fosforečná (85 %, Lachner) a kyselina octová (98 %, Lachema).

Pro přípravu roztoků byla používána deionizovaná voda (Millipore Milli-Q plus system, Millipore, USA). Používané roztoky byly uchovávány ve skleněných nádobách.

3.2 Aparatura

Pro voltametrická měření byla použita sestava EcoTribo Polarograph a software PolarPro 5.1 od firmy Polaro-Sensors, Praha. Přístroj pracoval v tříelektrodovém zapojení. Pracovní elektrodou byla rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná tuhá amalgámová elektroda m-AgSAE č. 04-2010-04 (ECO-TREND PLUS, ČR), referentní elektrodou byla argentchloridová elektroda ($3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ KCl) typu 10-20+polaro (Elektrochemické detektory, ČR) a jako pomocná elektroda byla využita platinová drátková elektroda typu PtE21polaro (Elektrochemické detektory, ČR).

Přesná hodnota pH byla měřena digitálním pH-metrem Jenway 4330 (Jenway, Essex, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou (typ 924 005). Pro kalibraci pH-metru byly použity standardní vodné pufrы za laboratorní teploty.

Pro spektrofotometrická měření byl využit spektrofotometr Pye-Unicam SP8-400 UV/VIS spectrophotometer (Cambridge, Velká Británie). Měření byla prováděna v křemenných kyvetách měrné tloušťky 1 cm.

Pro extrakci tuhou fází byly využity kolonky LiChrolut RP-18 firmy Merck (40-63 μm) 200 mg, 3 ml standardní extrakční PP-kolony.

3.3 Pracovní elektroda

Jako pracovní elektroda byla zvolena stříbrná tuhá amalgámová elektroda modifikovaná rtuťovým meniskem (m-AgSAE) č. 04-2010-04 (ECO-TREND PLUS, ČR).

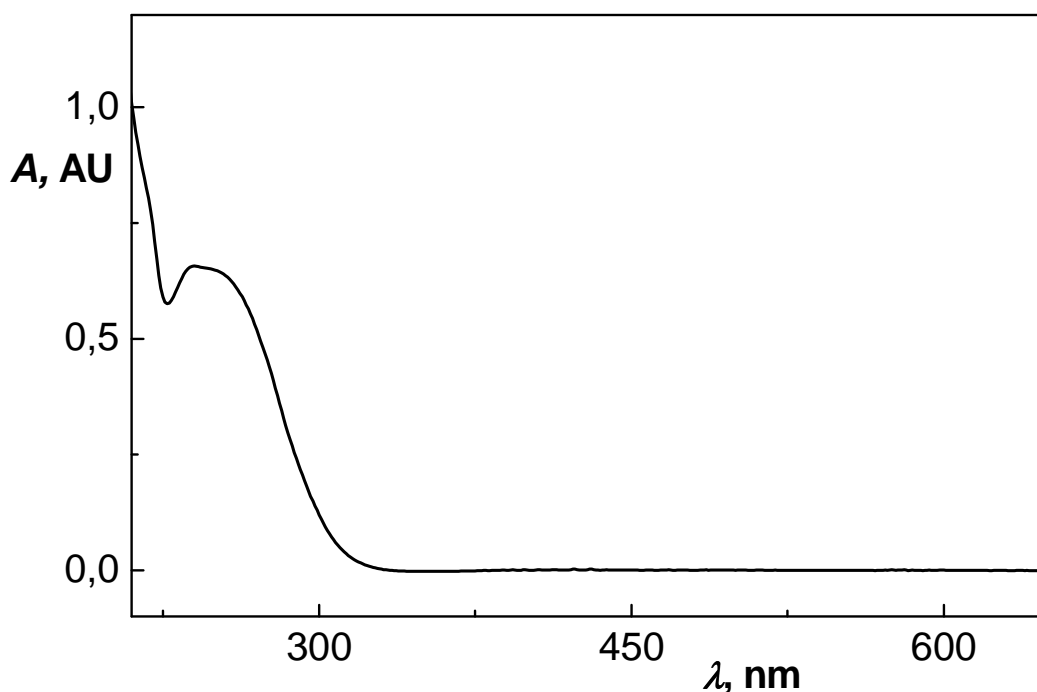
Pracovní elektroda byla pravidelně aktivována. Aktivace byla prováděna v míchaném roztoku $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ KCl, vložením napětí $-2,2 \text{ V}$ po dobu 300 s. Při aktivaci dochází k elektrochemickému čištění povrchu elektrody. Aktivace byla prováděna každý den před měřením, při přerušení práce po dobu delší než jednu hodinu a po ukončení měření.

Před každým měřením byla prováděna elektrochemická regenerace. Tato operace byla prováděna v měřeném roztoku při současném bublání dusíkem. Na elektrodu byl střídavě vkládán zápornější potenciál E_{in} a kladnější potenciál E_{fin} v intervalech 0,1 s po dobu 30 s. Hodnoty E_{in} a E_{fin} byly určeny experimentálně tak, aby bylo dosaženo co nejlepší opakovatelnosti výšky píků. Zpravidla se nacházejí uvnitř dostupného potenciálového okna. Mohou se lišit v závislosti na složení základního elektrolytu a stanovované látky. Nalezené hodnoty vhodných regeneračních potenciálů byly $E_{\text{in}} = -1100 \text{ mV}$ a $E_{\text{fin}} = +50 \text{ mV}$.

Po dlouhodobém přerušení práce (více než týden) byla také prováděna amalgamace, při které byl obnoven celý rtuťový meniskus tak, že elektroda byla ponořena na dobu 30 s do kapalné rtuti.

3.4 Stálost roztoku anilazinu

Stálost zásobního roztoku studované látky byla sledována spektrofotometricky. Pro tato měření byl zásobní roztok o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ anilazinu v methanolu 20x naředěn methanolem. V tomto roztoku bylo proměřeno absorpční spektrum v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1,0 cm. Měření byla prováděna oproti methanolu. Absorpční maximum anilazinu je při $\lambda = 240 \text{ nm}$ (Obr. 3) maximum při 200 nm patří methanolu).



Obr. 3

Absorpční spektrum roztoku anilazinu ($c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v methanolu. Měřeno oproti methanolu v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1,0 cm.

Absorbance roztoků anilazinu o koncentraci $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ připravených ze zásobního roztoku s postupujícím časem klesá, relativní hodnota absorbance během 2 týdnů poklesla přibližně o 5 % oproti původní hodnotě. Po více než 2 týdnech je pokles absorbance ještě výraznější. Výsledky měření jsou uvedeny

v Tab. 2. Tyto změny v absorbanci jsou pravděpodobně způsobeny reaktivitou anilazinu, který se částečně rozkládá hydroxyanilazin, jak bylo popsáno výše.

Z uvedených důvodů byl zásobní roztok používán maximálně 2 týdny, poté byl vždy připraven čerstvý zásobní roztok.

Tab. 2

Spektrofotometrické studium stálosti zásobního roztoku anilazinu. Roztoky o koncentraci anilazinu $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v methanolu byly měřené v oproti methanolu v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1,0 cm. Číselné hodnoty udávají absorbanci při absorpčním maximu ($\lambda = 240 \text{ nm}$) a relativní hodnoty absorbance oproti absorbanci čerstvě připraveného roztoku.

Den	Absorbance	[%]
1	0,6562	100,0
2	0,6575	100,2
4	0,6440	98,2
7	0,6359	96,9
8	0,6390	97,4
10	0,6304	96,1
13	0,6268	95,9
18	0,5967	90,9
20	0,5795	88,3

3.5 Pracovní postupy

Voltametrická měření byla prováděna na přístroji EcoTribo Polarograph s voltametrickou celou o objemu 10 ml. Byly použity 2 voltametrické metody: diferenční pulsní voltametrie (DPV) a adsorpční rozpouštěcí voltametrie (AdSV). Vzorek byl připraven odpipetováním stanoveného množství (0 – 1000 μl) zásobního roztoku anilazinu, přidán methanol tak, aby celkový objem methanolu byl 1 ml, a doplněn na 10 ml BR pufr o zvoleném pH. Měření probíhalo za laboratorní teploty, během měření vzorkem nebylo mícháno. Každý vzorek byl před samotným měřením 5 minut probubláván dusíkem, aby došlo k vytěsnění rozpuštěného kyslíku. Před každým dalším měřením byl vzorek krátce (30 s) znovu probublán dusíkem. Všechny křivky byly proměřeny alespoň třikrát. Mezi měřeními různých vzorků byly elektrody a voltametrická cela opláchnuty deionizovanou vodou.

Dále byly proměřeny koncentrační závislosti v modelových vzorcích vodovodní a říční vody. Vzorky byly připraveny odpipetováním 5 ml vodovodní/říční vody, do kterých bylo přidáno požadované množství (0 až 500 μl) zásobního roztoku anilazinu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), dále byl do vzorku doplněn methanol (na výsledných 10 % V/V) a BR pufr o $\text{pH} = 2$.

3.5.1 Diferenční pulsní voltametrie

Na pracovní elektrodu byly vkládány pulsy o šířce 100 ms a výšce -50 mV , rychlost polarizace byla $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$. Rozsah potenciálového okna závisel na pH analyzovaného roztoku a také na matici vzorku, v měřeních při $\text{pH} = 2$ byl potenciálový rozsah od -100 mV do -1100 mV v deionizované vodě a od -100 mV do přibližně -1000 mV v říční vodě.

3.5.2 Adsorpční rozpouštěcí voltametrie

Na pracovní elektrodu byly vkládány pulsy o šířce 100 ms a výšce -50 mV , rychlost polarizace byla $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$. Rozsah potenciálového okna závisel na matici vzorku, při $\text{pH} = 2$ byl od -100 mV do -1100 mV v deionizované vodě a od -100 mV do přibližně -1000 mV v říční vodě.

Akumulace při AdSV byla prováděna v míchaném roztoku, nalezené vhodné parametry akumulace byly: potenciál akumulace $E_{\text{acc}} = -100 \text{ mV}$ a doba akumulace $t_{\text{acc}} = 60 \text{ s}$. Po skončení akumulace bylo míchání vypnuto a po ustálení po 5 s byl proveden záznam DPV.

3.5.3 Vyhodnocování naměřených křivek

Pík anilazinu se nacházel v blízkosti okraje potenciálového okna, což ovlivnilo vyhodnotitelnost některých křivek, zejména křivek ve složitějších matricích o nižších koncentracích anilazinu. Pokud to bylo možné, byla vyhodnocena výška píku nad základní linií při potenciálu odpovídajícím maximu píku. Pokud byl pík překryt rozkladem základního elektrolytu a výše uvedený postup vyhodnocení by byl nepřesný, bylo vyhodnocení provedeno odečtem proudu základního elektrolytu od proudu měřeného roztoku při daném potenciálu (-827 mV). Tento způsob vyhodnocování se týkal měření koncentračních závislostí v říční vodě.

3.5.4 Určení limitu stanovitelnosti

Limit stanovitelnosti (L_Q) byl určen z 10 za sebou jdoucích měření proudů píku roztoků o nejnižší stanovované koncentraci anilazinu (ve většině případů $1 \cdot \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$). Ze získaných I_p byla určena směrodatná odchylka, jejíž desetinásobek byl vydělen směrnici příslušné kalibrační závislosti.

3.5.5 Prekoncentrace tuhou fází

Prekoncentrace tuhou fází (SPE, solid phase extraction) byla prováděna s kolonkami LiChrolut RP-18, 200 mg, 3 ml standard PP-tubes (Merck). Stanovené množství zásobního 0 až 1000 μl zásobního roztoku anilazinu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), bylo odpipetováno do 100ml odměrných baněk a doplněno říční vodou. Po promíchání byly vzorky převedeny na předem kondiciované kolonky. Kondicionace každé kolonky spočívala v promytí 10 ml methanolu a poté 10 ml deionizované vody. Po extrakci byla provedena eluce methanolem.⁹ Eluáty byly doplněny na 10 ml BR puřem o pH 2. Poté byly proměřeny voltametrické křivky pomocí DPV.

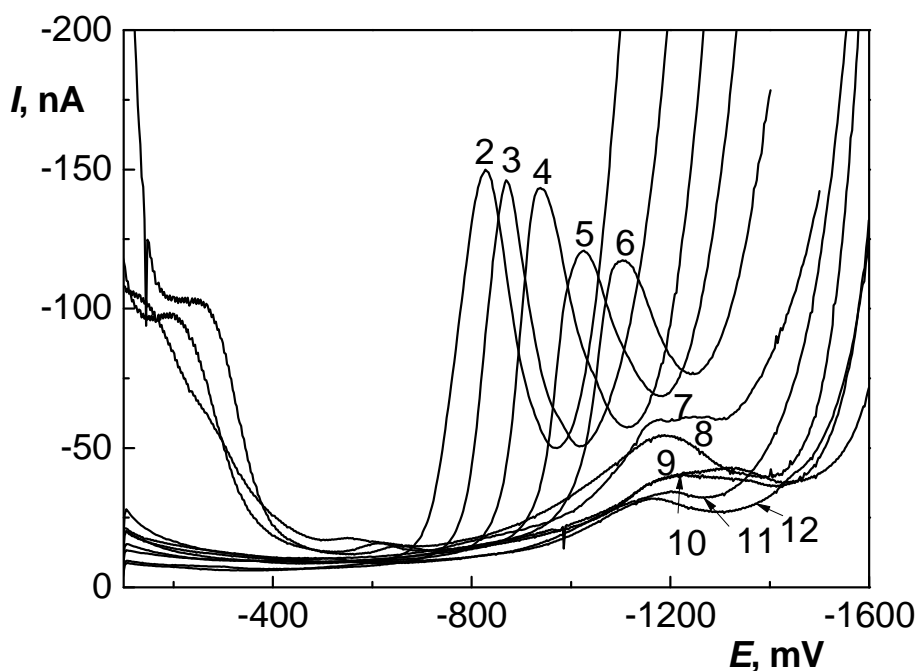
4 Výsledky a diskuze

4.1 Diferenční pulsní voltametrie anilazinu

4.1.1 Vliv pH

Tvar voltametrické křivky a elektrochemická odezva anilazinu jsou silně závislé na pH. Redukce triazinů začíná protonizací triazinového kruhu, probíhá proto lépe v kyselém prostředí. Tomu odpovídají i výsledky zjištěné z pH závislosti. Signál je vysoký při kyselém pH, s rostoucím pH signál klesá a v zásaditém prostředí je již nízký.

Pro zjištění pH závislosti byly prozkoumány voltametrické křivky anilazinu na m-AgSAE v roztocích BR-pufry o pH 2 – 12. Látka poskytuje jeden pík, který je vyhodnotitelný v rozmezí pH 2 – 6. Voltametrické křivky zobrazuje Obr. 4.



Obr. 4

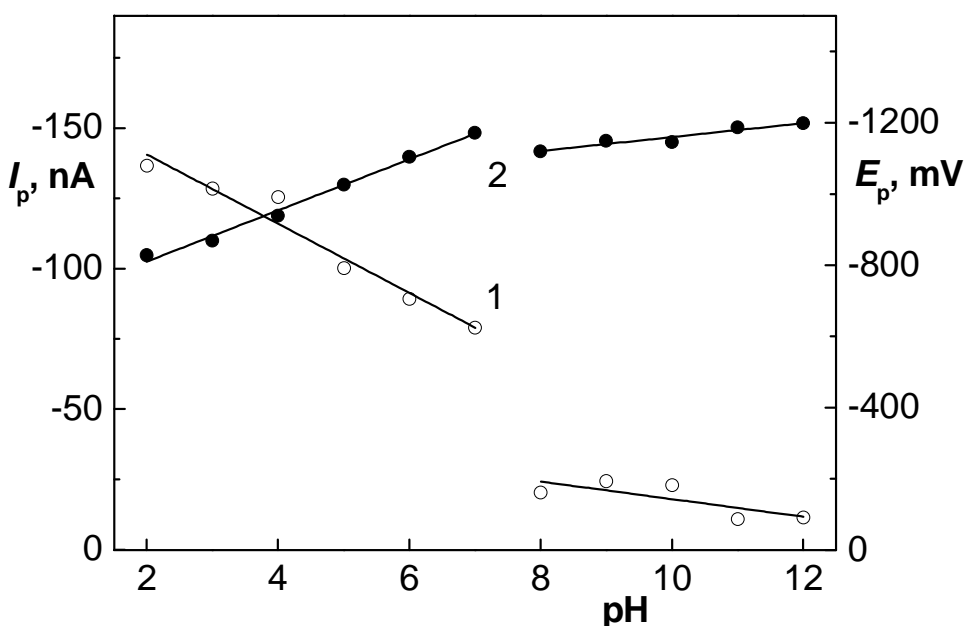
Vliv pH na DP voltamogramy anilazinu ($c = 100 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$). Měřeno technikou DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufru a methanolu (9:1), čísla křivek odpovídají pH použitého BR pufru.

Potenciál píku je blízký okraji potenciálového okna a pík je částečně překryt rozkladem základního elektrolytu. Potenciál píků roste s rostoucím pH až do pH 7, při vyšším pH již není patrný posun píků, ale signál je již nízký a křivky jsou obtížně vyhodnotitelné (Obr. 5). Signál je maximální při pH = 2, při vyšším pH proud klesá a při pH > 7 je již minimální. Ze zjištěných hodnot proudu (I_p) a potenciálu (E_p) byly metodou lineární regrese vypočteny následující závislosti těchto veličin na pH, přičemž celý měřený rozsah byl rozdělen do 2 oblastí:

$$\text{pH } 2 - 7: E [\text{mV}] = -71,8 \cdot \text{pH} - 666,4 \quad (\text{korelační koeficient } -0,9946)$$

$$\text{pH } 8 - 12: E [\text{mV}] = -19,6 \cdot \text{pH} - 963,6 \quad (\text{korelační koeficient } -0,9416)$$

Pro další experimenty bylo tedy zvoleno jako optimální prostředí pH = 2. To odpovídá optimálním podmínkám studie ⁵⁷.

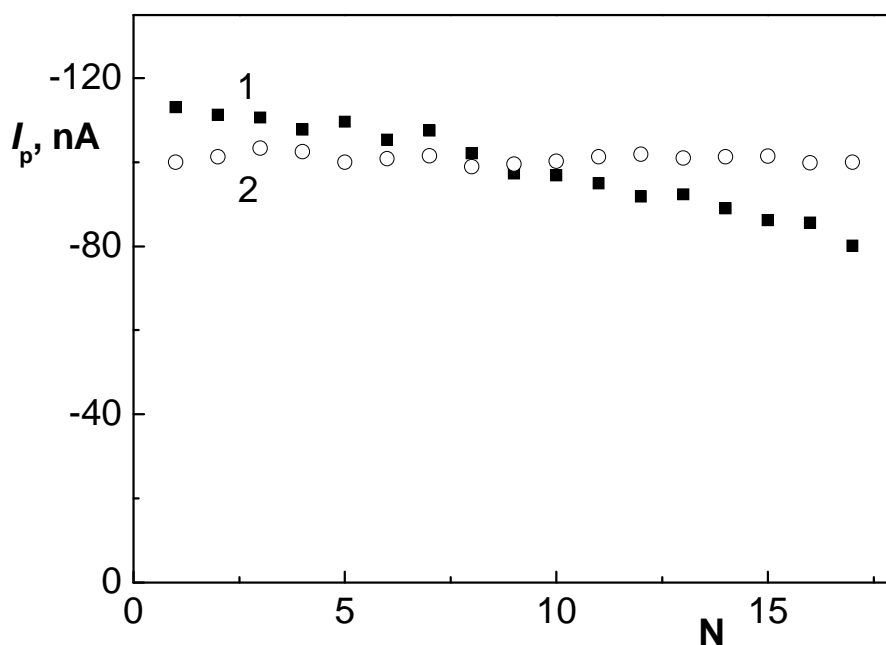


Obr. 5

Závislost proudů a potenciálů píků anilazinu ($c = 100 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na pH roztoku. Měřeno technikou DPV na m-AgSAE v BR pufru a methanolu (9:1) 1 – proud píku, 2 – potenciál píku.

4.1.2 Opakovatelnost měření

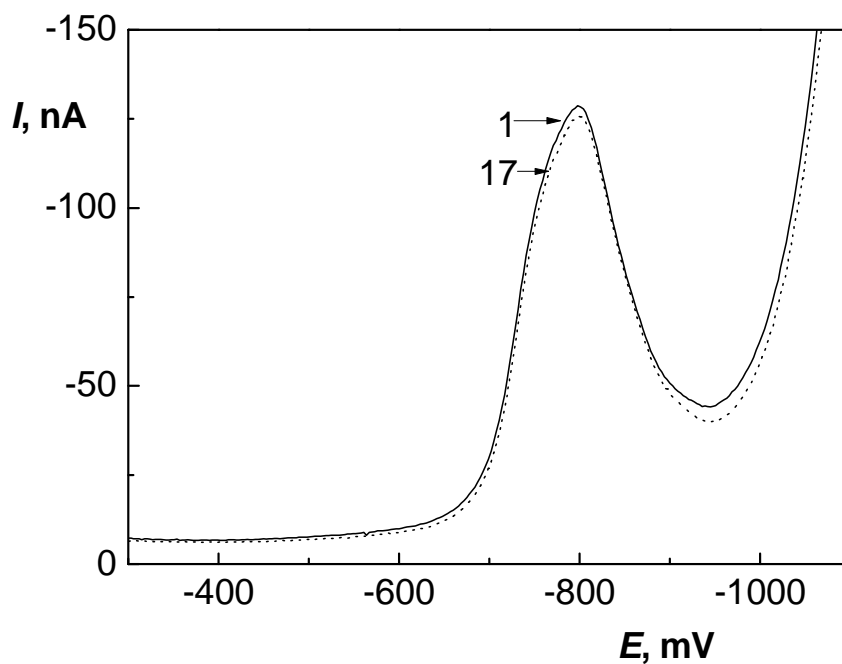
Při voltametrických analýzách na tuhých pracovních elektrodách často dochází k některým jevům, jako jsou pasivace elektrody nebo adsorpce látky na elektrodě, které mají za následek změny v odezvě, pokud je prováděno více analýz za sebou bez očištění elektrody. V případě stanovení anilazinu na m-AgSAE docházelo k pasivaci elektrody a poklesu signálu. Pokles signálu byl během 20 měření o více než 10 %. Aby bylo dosaženo co nejstálějších výsledků v sérii analýz, byla před každou analýzou zařazena elektrochemická regenerace elektrody, která spočívala v rychlém střídání kladného a záporného potenciálu. Hodnoty regeneračních potenciálů byly hledány experimentálně, aby bylo dosaženo co nejnižšího poklesu signálu. Zvolené hodnoty regeneračních potenciálů byly: $E_{in} = -1100$ mV a $E_{fin} = +50$ mV. Za těchto podmínek bylo dosaženo akceptovatelné opakovatelnosti měření, když pokles signálu během 17 za sebou následujících měření byl o 1,1 % (Obr. 6, Obr. 7).



Obr. 6

Opakovatelnost měření: Proudová odezva v závislosti na počtu měření (N) pro roztok anilazinu ($c = 100 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v BR pufru ($\text{pH} = 2$) s obsahem methanolu 10 %

(V/V). Měřeno technikou DPV na m-AgSAE. Křivka 1 – měření prováděné bez regenerace, pokles signálu v 17 měřeních byl 11,4 %. Křivka 2 – měření prováděné s regenerací. Potenciály regenerace byly $E_{in} = -1100$ mV, $E_{fin} = +50$ mV. Pokles signálu v 17 měřeních byl 1,1 %.

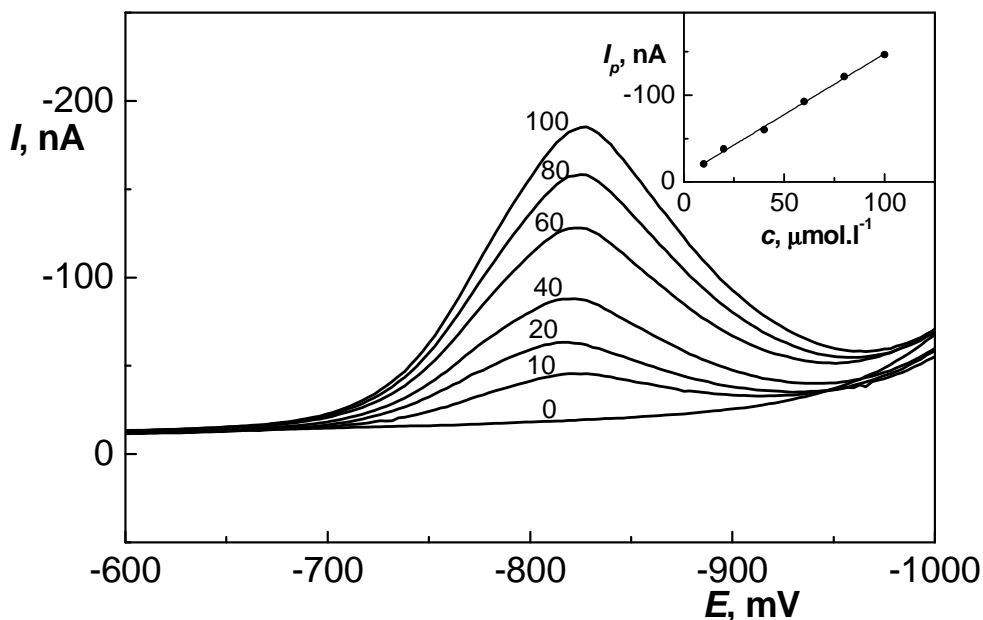


Obr. 7

1. a 17. voltamogram při opakovaných měřeních roztoku anilazinu ($c = 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) v BR pufru ($\text{pH} = 2$) s obsahem methanolu 10 % (V/V). Měřeno technikou DPV na m-AgSAE, mezi jednotlivými měřeními byla provedena regenerace $E_{in} = -1100$ mV, $E_{fin} = +50$ mV.

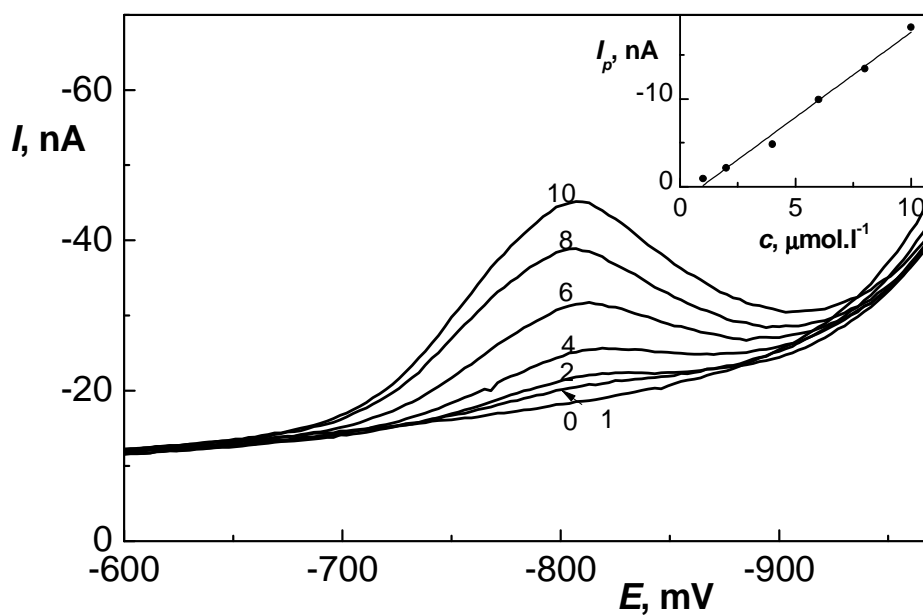
4.1.3 Koncentrační závislost

Koncentrační závislosti byly proměřeny v různých matricích v koncentračním rozsahu $1\text{--}100\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Nejprve byla proměřena koncentrační závislost v roztoku BR pufru o $\text{pH} = 2$ s 10% (V/V) methanolu. Voltametrické křivky koncentračního rozmezí $10\text{--}100$ a $1\text{--}10\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ s příslušnými kalibračními závislostmi jsou zobrazeny na Obr. 8, resp. Obr. 9. Roztok o nejnižší měřené koncentraci (tedy $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) byl proměřen vícekrát (Obr. 10), tato měření pak sloužila k výpočtu limitu stanovitelnosti. Parametry kalibračních závislostí a limit stanovitelnosti jsou uvedeny v Tab. 3.



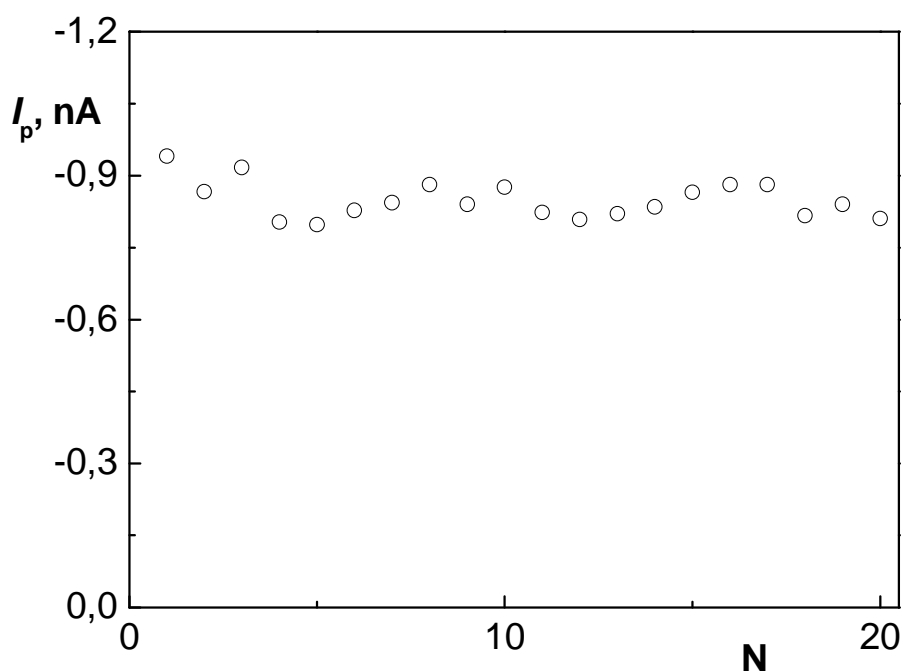
Obr. 8

Voltamogramy anilazinu ($10 - 100\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, čísla nad křivkami odpovídají měřené koncentraci) měřené technikou DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufru ($\text{pH} = 2$) s obsahem methanolu 10% (V/V). Před jednotlivými měřeními byla provedena regenerace elektrody ($E_{in} = -1100\ \text{mV}$, $E_{fin} = +50\ \text{mV}$). Do obrázku je vložena příslušná kalibrační závislost.



Obr. 9

Voltamogramy anilazinu ($1 - 10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, čísla nad křivkami odpovídají měřené koncentraci) měřené technikou DPV na $m\text{-AgSAE}$ v prostředí BR pufru ($\text{pH} = 2$) s obsahem methanolu 10 % (V/V). Před jednotlivými měřeními byla provedena regenerace elektrody ($E_{in} = -1100 \text{ mV}$, $E_{fin} = +50 \text{ mV}$). Do obrázku je vložena příslušná kalibrační závislost.



Obr. 10

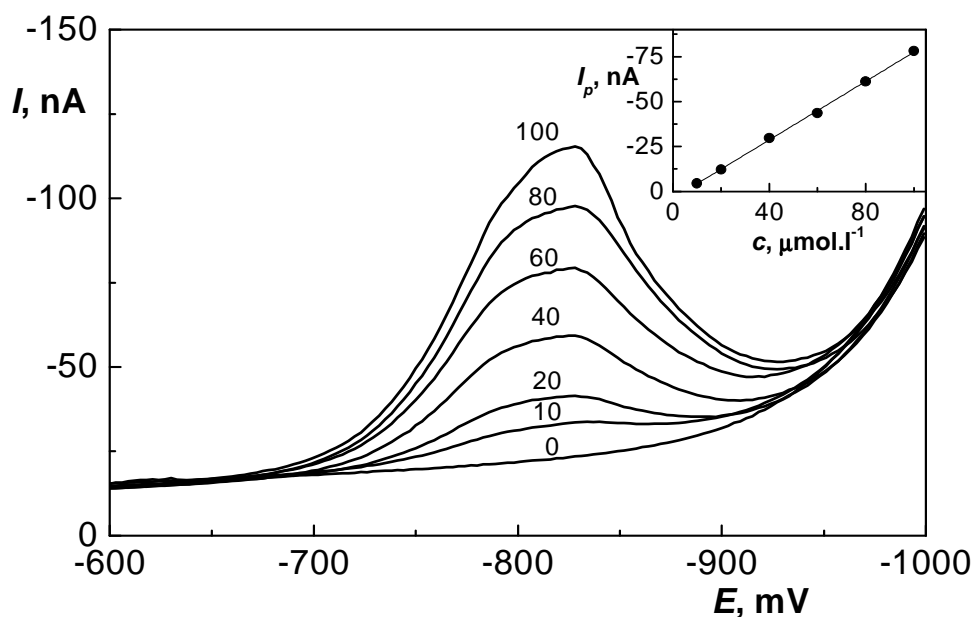
Opakovatelnost měření. Proudová odezva v závislosti na počtu měření pro roztok anilazinu ($c = 1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) měřené technikou DPV na *m*-AgSAE v prostředí BR pufru ($\text{pH} = 2$) s obsahem methanolu 10 % (V/V). Před jednotlivými měřeními byla provedena regenerace ($E_{in} = -1100 \text{ mV}$, $E_{fin} = +50 \text{ mV}$). Pokles signálu ve 20 měřeních byl 4,6 %.

Tab. 3

Parametry koncentračních závislostí pro stanovení anilazinu metodou DPV na *m*-AgSAE v v BR pufru ($\text{pH} = 2$) s obsahem methanolu 10 % (V/V).

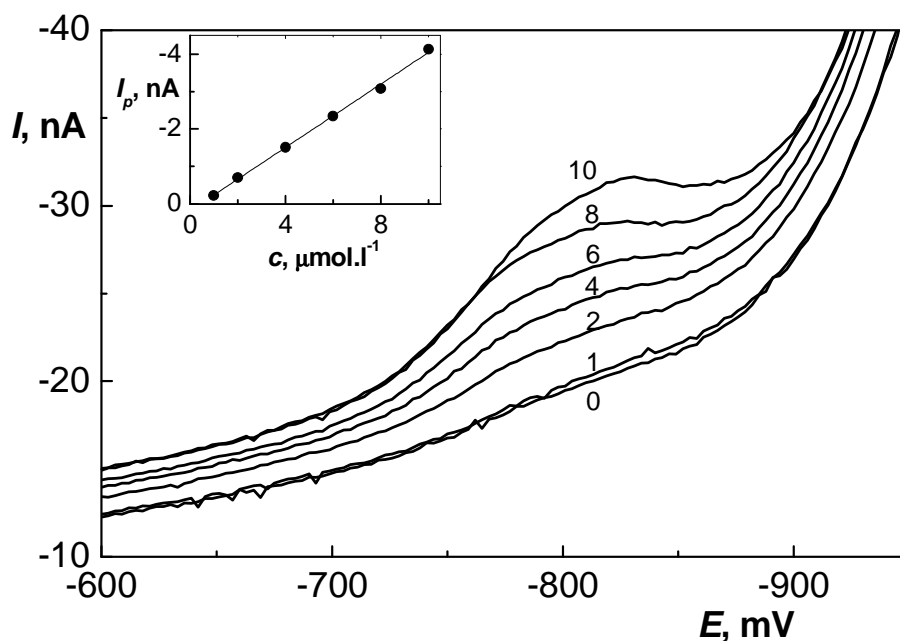
Koncentrace [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	Směrnice [$\text{nA}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$]	Úsek [nA]	Koef. korelace	L_Q [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]
10-100	$-1,40\cdot 10^6$	-7,47	-0,9988	–
1-10	$-1,94\cdot 10^6$	1,78	-0,9938	0,61

Po ověření použitelnosti vyvinuté metody v jednoduchých přírodních matricích byly proměřeny koncentrační závislosti také v modelových vzorcích vodovodní (Obr. 11, Obr. 12) a říční vody (Obr. 13, Obr. 14). Změna matrice způsobila, že rozklad základního elektrolytu nastával dříve než v samotném pufru. Okraj potenciálového okna se posunul ke kladnějším hodnotám, ještě blíže k píku anilazinu, tento posun byl výraznější u říční vody. Popsaný jev měl za následek, že voltametrické křivky nižšího koncentračního řádu ($1 - 10 \cdot \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) byly obtížněji vyhodnotitelné, proto nebyla stanovována výška píku od spojnice minim po stranách píku, ale od signálu vyhodnocované křivky byl odečten proud základního elektrolytu. Parametry kalibračních závislostí a limity stanovitelnosti jsou uvedeny v Tab. 4 a Tab. 5.



Obr. 11

Voltamogramy anilazinu v pitné vodě ($10 - 100 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, čísla nad křivkami odpovídají měřené koncentraci) měřené technikou DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufru ($\text{pH} = 2$) s obsahem methanolu 10 % (V/V). Před jednotlivými měřeními byla provedena regenerace elektrody ($E_{\text{in}} = -1100 \text{ mV}$, $E_{\text{fin}} = +50 \text{ mV}$). Do obrázku je vložena příslušná kalibrační závislost.



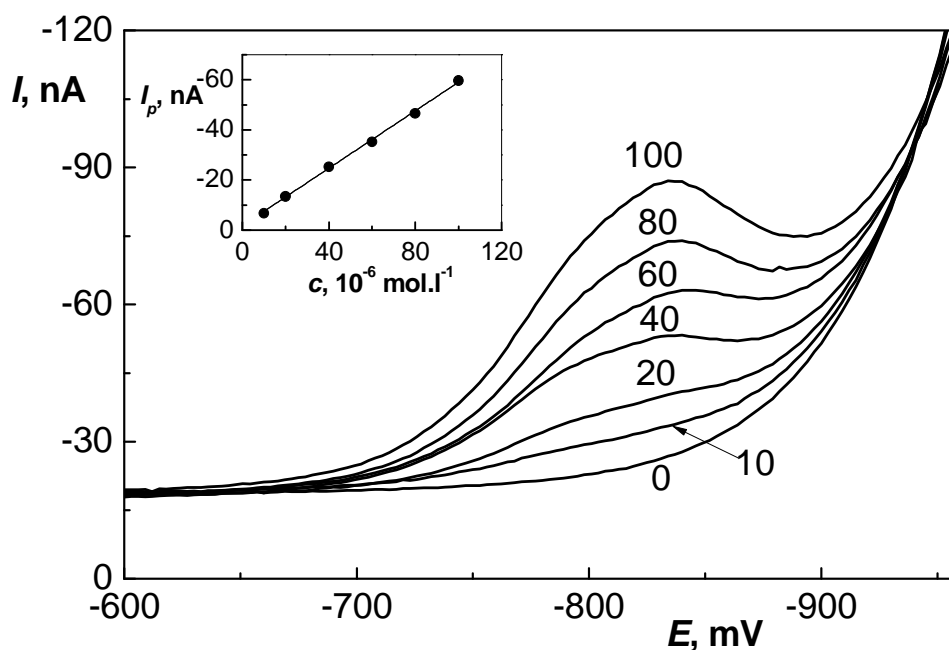
Obr. 12

Voltamogramy anilazinu v pitné vodě ($2 - 10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, čísla nad křivkami odpovídají měřené koncentraci) měřené technikou DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufru ($\text{pH} = 2$) s obsahem methanolu 10 % (V/V). Před jednotlivými měřeními byla provedena regenerace elektrody ($E_{\text{in}} = -1100 \text{ mV}$, $E_{\text{fin}} = +50 \text{ mV}$). Do obrázku je vložena příslušná kalibrační závislost.

Tab. 4

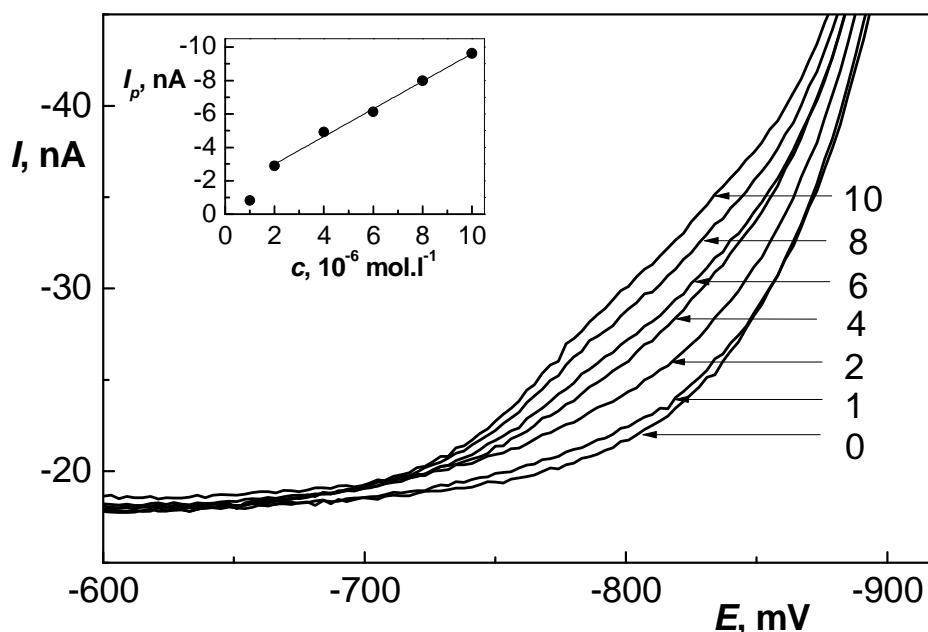
Parametry koncentračních závislostí pro stanovení anilazinu v pitné vodě metodou DPV na m-AgSAE v BR pufru ($\text{pH} = 2$) s obsahem methanolu 10 % (V/V).

Koncentrace [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	Směrnice [$\text{nA}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$]	Úsek [nA]	Koef. korelace	L_Q [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]
10-100	$-0,813\cdot 10^6$	-3,847	-0,9989	-
1-10	$-0,423\cdot 10^6$	0,186	-0,9973	0,65



Obr. 13

Voltamogramy anilazinu v říční vodě ($10 - 100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, čísla nad křivkami odpovídají měřené koncentraci) měřené technikou DPV na $m\text{-AgSAE}$ v prostředí BR pufru ($\text{pH} = 2$) s obsahem methanolu 10 % (V/V). Před jednotlivými měřeními byla provedena regenerace elektrody ($E_{in} = -1100 \text{ mV}$, $E_{fin} = +50 \text{ mV}$). Do obrázku je vložena příslušná kalibrační závislost. Pro vyhodnocení bylo použito odečtu proudu základního elektrolytu od proudu stanovovaného roztoku při $E = -827 \text{ mV}$.



Obr. 14

Voltamogramy anilazinu v říční vodě ($2 - 10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, čísla křivek odpovídají měřené koncentraci) měřené technikou DPV na $m\text{-AgSAE}$ v prostředí BR pufru ($\text{pH} = 2$) s obsahem methanolu 10 % (V/V). Před jednotlivými měřeními byla provedena regenerace elektrody ($E_{\text{in}} = -1100 \text{ mV}$, $E_{\text{fin}} = +50 \text{ mV}$). Do obrázku je vložena příslušná kalibrační závislost. Pro vyhodnocení bylo použito odečtu proudu základního elektrolytu od proudu stanovovaného roztoku při $E = -827 \text{ mV}$.

Tab. 5

Parametry koncentračních závislostí pro stanovení anilazinu v říční vodě metodou DPV na $m\text{-AgSAE}$ v prostředí BR pufru o $\text{pH} = 2$ a obsahu methanolu 10 % (V/V).

Koncentrace [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	Směrnice [$\text{nA}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$]	Úsek [nA]	Koef. korelace	L_Q [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]
10 – 100	$-0,572\cdot 10^6$	-1,843	-0,9985	–
2 – 10	$-0,827\cdot 10^6$	-1,344	-0,9945	3,2·

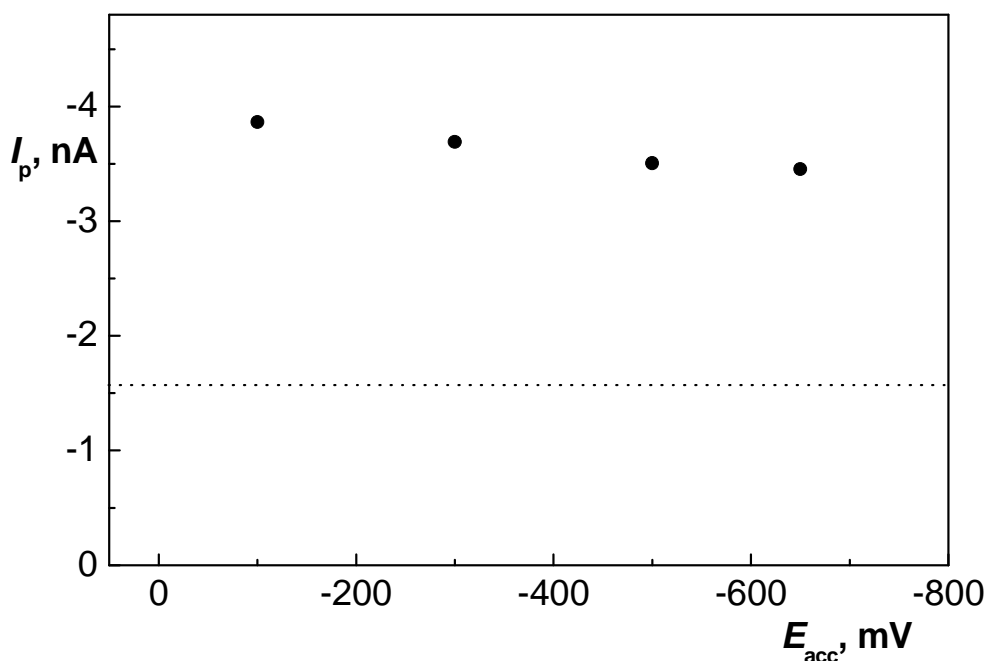
4.2 Adsorpční rozpouštěcí voltametrie

Jednou z možností, jak zvýšit citlivost stanovení, je zvýšit koncentraci analytu na pracovní elektrodě například pomocí adsorpční rozpouštěcí voltametrie. Při této metodě je využito povrchové aktivity některých organických sloučenin, které se adsorbují na povrch pracovní elektrody. Následně je naakumulovaný analyt rozpuštěn redukčním nebo oxidačním skenem. Adsorpční rozpouštěcí voltametrie patří mezi velmi citlivé voltametrické metody, lze jí dosáhnout výrazně nižších stanovitelných koncentrací než jakých lze dosáhnout pomocí DPV. Omezením však je skutečnost, že ne všechny elektroaktivní látky se sorbují na rtuťové elektrody.

V práci byla ověřována možnost použití adsorpční rozpouštěcí voltametrie na meniskem modifikované stříbrné tuhé amalgámové elektrodě ke stanovení anilazinu.

Pro měření bylo použito pracovní nastavení a parametry převzaté z předchozích měření pomocí DPV, tj. pH = 2, bublání dusíkem po dobu 5 minut, potenciály pro regeneraci pracovní elektrody $E_{in} = -1100$ mV, $E_{fin} = +50$ mV apod. Navíc byla do měření zařazena prekoncentrace analytu. Tento krok byl zařazen mezi regeneraci pracovní elektrody a samotnou analýzu. Po zvolenou dobu byl na pracovní elektrodu vložen konstantní potenciál o zvolené hodnotě.

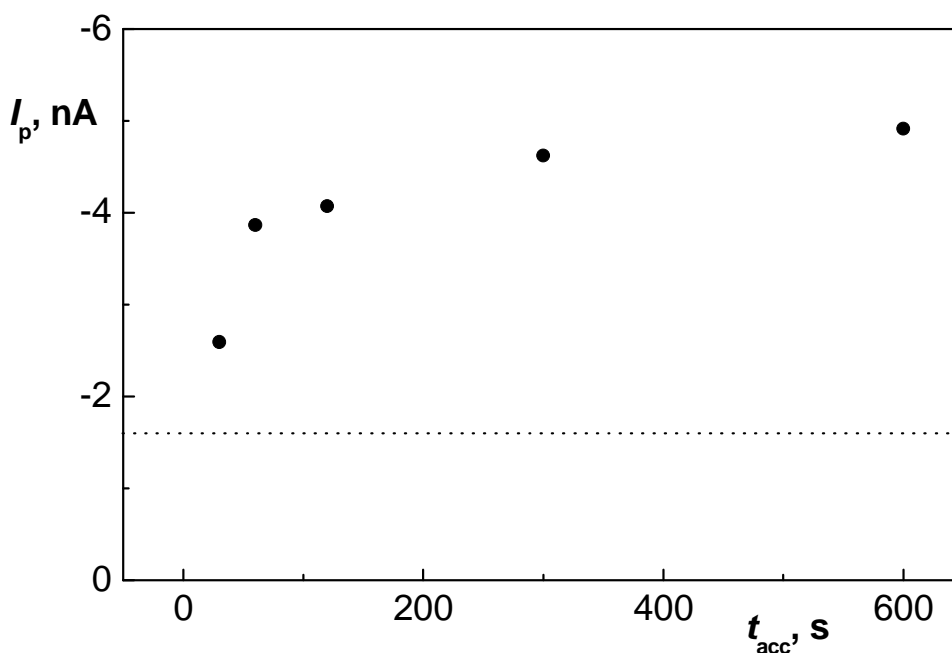
Před naměřením koncentračních závislostí byly hledány vhodné podmínky pro úspěšné použití této metody. Sledovanými parametry byly potenciál a doba akumulace. Nejprve byl nalezen optimální potenciál akumulace (Obr. 15). Oblast možných potenciálů akumulace bylo rozmezí -100 až -700 mV, tedy od počátku potenciálového okna až po nejzápornější potenciál, při kterém ještě ve vzorku neprobíhá redukce analytu. Doba akumulace byla v tomto případě 60 s. Bylo zjištěno, že k akumulaci dochází, přičemž hodnota potenciálu příliš neovlivňuje míru adsorpce. Maximálního signálu bylo dosaženo při potenciálu -100 mV.



Obr. 15

Vliv potenciálu akumulace na výšku signálu anilazinu ($10 \cdot \mu \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$), doba akumulace byla 60 s. Voltamogramy anilazinu byly měřené technikou AdSV na m-AgSAE v prostředí BR pufru ($\text{pH} = 2$) s obsahem methanolu 10 % (V/V). Před jednotlivými měřeními byla provedena regenerace elektrody ($E_{in} = -1100 \text{ mV}$, $E_{fin} = +50 \text{ mV}$). Tečkovaně je zobrazena hodnota proudu píku změřená bez předchozí akumulace ($I_p = -1,57 \text{ nA}$).

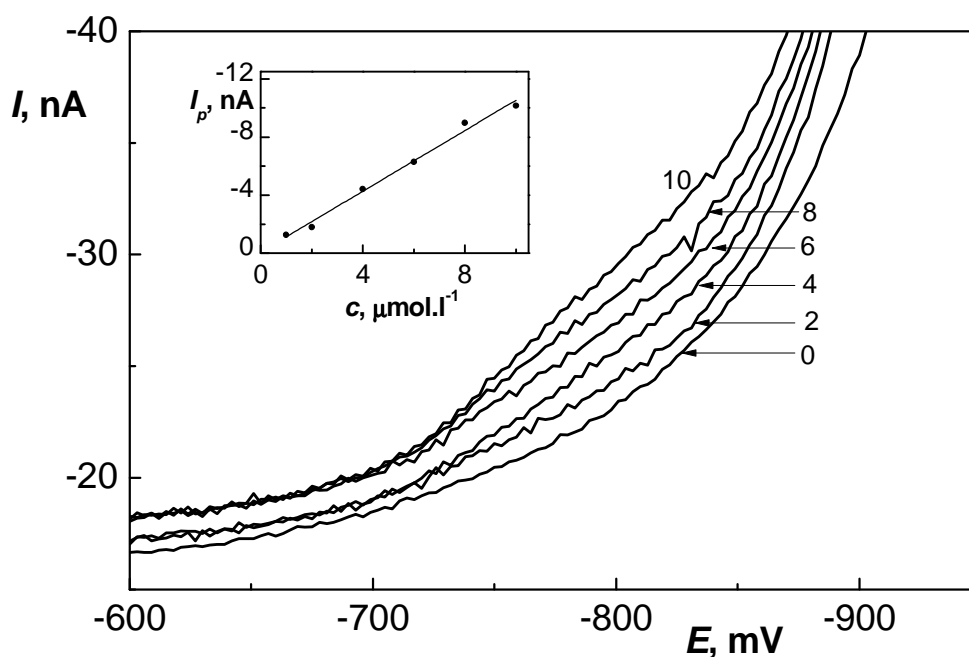
Dále byl zkoumán vliv doby adsorpce na hodnotu proudu píku (Obr. 16). Bylo potvrzeno, že s delší dobou adsorpce se signál zvyšuje. Ovšem při době adsorpce nad 1 minutu již nárůst není příliš razantní. Při této době došlo k zvýšení signálu 2,5x oproti měření bez adsorpce, kdežto při 600 s došlo k trojnásobnému zvýšení signálu. Vzhledem k časové náročnosti byla vybrána jako vhodná doba adsorpce 60 s.



Obr. 16

Vliv doby akumulace na výšku signálu anilazinu ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), doba akumulace byla 60 s. Voltamogramy anilazinu byly měřené technikou AdSV na m-AgSAE v BR pufru ($\text{pH} = 2$) s obsahem methanolu 10 % (V/V). Před jednotlivými měřeními byla provedena regenerace elektrody ($E_{in} = -1100 \text{ mV}$, $E_{fin} = +50 \text{ mV}$). Tečkovaně je zobrazena hodnota proudu změřená bez předchozí akumulace ($I_p = -1,57 \text{ nA}$).

Po nalezení optimálních podmínek AdSV byla proměřena koncentrační závislost anilazinu v říční vodě. Měření bylo prováděno na m-AgSAE v BR pufru o $\text{pH} = 2$ s obsahem methanolu 10 % (V/V). Koncentrační rozsah byl $0,1 - 10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. (Obr. 17) Pro vyhodnocování koncentrační závislosti bylo použito odečtu proudu základního elektrolytu od proudu stanovovaného roztoku při potenciálu $E = -827 \text{ mV}$. Vypočítané parametry získaných kalibračních závislostí udává Tab. 6. Křivky pro koncentrační rozsah $0 - 1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ nejsou zobrazeny, jelikož signál byl natolik nízký, že se nacházel pod mezí stanovitelnosti.



Obr. 17

Voltamogramy anilazinu v říční vodě ($1 - 10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, čísla křivek odpovídají měřené koncentraci) měřené technikou AdSV na *m*-AgSAE v BR pufru ($\text{pH} = 2$) s obsahem methanolu 10 % (V/V). Před jednotlivými měřeními byla provedena regenerace elektrody ($E_{\text{in}} = -1100 \text{ mV}$, $E_{\text{fin}} = +50 \text{ mV}$). Podmínky akumulace byly: $E_{\text{acc}} = -100 \text{ mV}$, $t_{\text{acc}} = 60 \text{ s}$. Do obrázku je vložena příslušná kalibrační závislost.

Tab. 6

Parametry koncentračních závislostí pro přímé stanovení anilazinu v říční vodě metodou AdSV na *m*-AgSAE v prostředí BR pufru o $\text{pH} = 2$ s obsahem methanolu 10 % (V/V).

Koncentrace [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	Směrnice [$\text{nA}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$]	Úsek [nA]	Koef. korelace	L_Q [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]
1 – 10	$-1,0449\cdot 10^6$	-0,0863	-0,9905	0,5

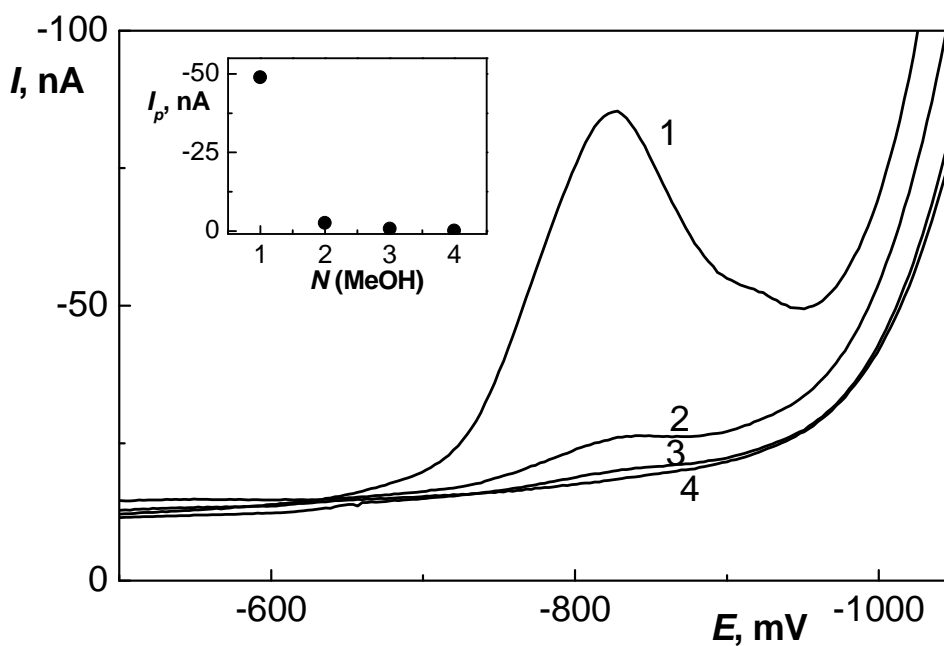
4.3 Prekoncentrace tuhou fází (SPE)

SPE je spolu s extrakcí kapalina-kapalina nejvyužívanější metodou pro zakoncentrování analytu. Vhodným nastavením podmínek, výběrem vhodných sorbetů a eluentů lze dosáhnout deseti- až tisícinásobného zakoncentrování. Úspěšnost použití SPE je také dána výtěžkem extrakce.

Výhody ve srovnání s klasickou extrakční metodou kapalina – kapalina je nízká spotřeba rozpouštědla a případná automatizace. SPE nabízí velké množství sorbentů jak pro hydrofóbní, tak pro polární i iontové interakce, zatímco extrakce kapalina – kapalina je limitována rovnováhou v kapalné fázi.

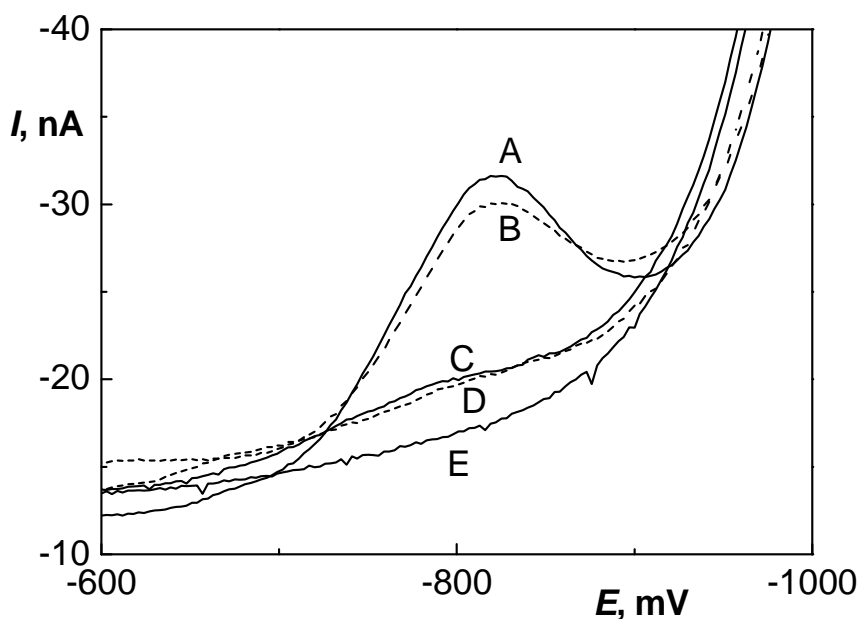
Podmínky extrakce triazinů z vody popisují studie ^{9, 43}. Pro účely této diplomové práce byla popsána metoda upravena. Pro SPE byla v této práci použita 200mg kolonka Lichrolut RP18. Objem vzorků byl 100 ml (objem vzorků i použitá kolonka byly tedy 10 x menší než v citovaných studiích), eluce byla prováděna 1 ml methanolu oproti popisovaným 4 ml methanolu. Vyšší obsah methanolu měl totiž vliv na tvar voltametrické křivky a pík byl posunut do zápornějších hodnot potenciálu, čímž byl více skryt rozkladem základního elektrolytu, byl tedy hůře vyhodnotitelný. Jelikož v předchozích experimentech byl obsah methanolu 10 % (V/V), bylo zkoumáno, zda je možno provést eluci pouze s 1 ml methanolu. Bylo zjištěno, že více než 90 % eluované látky je obsaženo již v prvním mililitru eluátu a ve třetím a čtvrtém mililitru je obsaženo již pouze zanedbatelné množství látky (Obr. 18). K dalším experimentům byl tedy používán jen 1 ml MeOH eluátu (další 3 ml MeOH byly použity pro vyčištění kolonky).

Byla porovnána výtěžnost extrakce pro 2 různé koncentrace anilazinu: $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. V obou případech byla potvrzena výtěžnost 90 % (Obr. 19).



Obr. 18

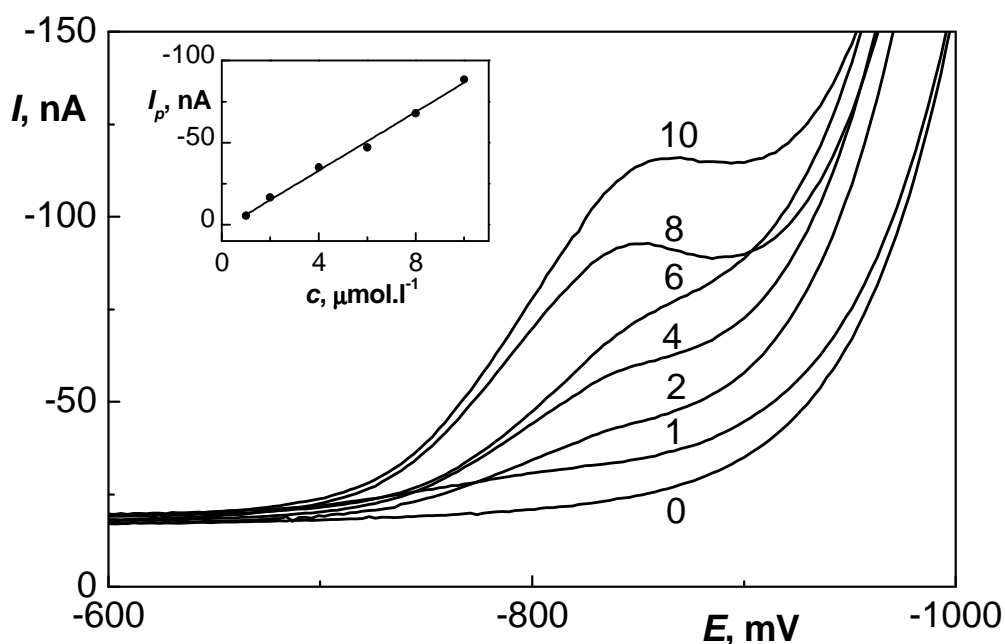
Obsah anilazinu v jednotlivých podílech methanolového eluátu z SPE kolonky, kterou bylo extrahováno 100 ml roztoku anilazinu v deionizované vodě ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Číslo křivek odpovídá pořadí frakce methanolu použitého k eluci (N (MeOH)). Voltamogramy roztoků získaných z jednotlivých frakcí doplněných BR puforem o $\text{pH} = 2$ na 10 ml měřené technikou DPV na m-AgSAE. Před jednotlivými měřeními byla provedena regenerace elektrody ($E_{\text{in}} = -1100 \text{ mV}$, $E_{\text{fin}} = +50 \text{ mV}$).



Obr. 19

Výtěžnost SPE. Voltametrické křivky anilazinu o koncentraci $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (A, B) a $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (C, D) **Plná čára:** přidavek anilazinu do roztoku 1 ml methanolvého eluátu doplněného na 10 ml BR puřrem o pH = 2; **čárkovaně:** roztok anilazinu o dané koncentraci v řiční vodě po SPE eluován 1 ml methanolu, doplněn na 10 ml BR puřrem o pH = 2; **křivka E** roztok methanolvého eluátu s nulovou koncentrací anilazinu doplněný na 10 ml BR puřrem o pH = 2. Před jednotlivými měřeními byla provedena regenerace elektrody ($E_{in} = -1100 \text{ mV}$, $E_{fin} = +50 \text{ mV}$).

Po ověření použitelnosti SPE k prekoncentraci anilazinu byla proměřena koncentrační závislost. Z přefiltrované řiční vody byly připraveny roztoky o objemu 100 ml a koncentraci anilazinu $0,1\text{--}10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Ty byly převedeny na extrakční kolonky, ze kterých byl anilazin eluován 1 ml methanolu. Získaný eluát byl doplněn na 10 ml BR puřrem o pH = 2. V takto připravených roztocích byly proměřeny voltametrické křivky pomocí DPV (Obr. 20). Zjištěné parametry kalibračních závislostí jsou uvedeny v Tab. 7. Křivky pro koncentrační rozsah $0\text{--}1,0 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ nejsou zobrazeny, jelikož potenciálové okno je příliš zkráceno a signál je nevyhodnotitelný.



Obr. 20

Koncentrační závislost anilazinu extrahovaného z říční vody pomocí SPE. Voltamogramy anilazinu (1 – 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, čísla křivek odpovídají koncentraci v původním roztoku před extrakcí) měřené technikou DPV na $m\text{-AgSAE}$ v BR pufru ($\text{pH} = 2$) s obsahem methanolu 10 % (V/V). Před jednotlivými měřeními byla provedena regenerace elektrody ($E_{\text{in}} = -1100 \text{ mV}$, $E_{\text{fin}} = +50 \text{ mV}$). Do obrázku je vložena příslušná kalibrační závislost.

Tab. 7

Parametry koncentračních závislostí pro přímé stanovení anilazinu v říční vodě metodou DPV na $m\text{-AgSAE}$ v prostředí BR pufru o $\text{pH} = 2$ a obsahu methanolu 10 % (V/V) po předchozí prekoncentraci SPE.

Koncentrace [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	Směrnice [$\text{nA}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$]	Úsek [nA]	Koef. korelace	L_Q [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]
1 – 10	$-8,94\cdot 10^6$	2,80	-0,9933	–
0,1 – 1,0	$-11,6\cdot 10^6$	-0,38	-0,9947	0,2·

5 Závěr

Tato diplomová práce se zabývala stanovením triazinového pesticidu anilazinu na meniskem modifikované stříbrné tuhé amalgámové elektrodě. K tomuto účelu byla použita metoda diferenční pulsní voltametrie. Jelikož elektrochemická redukce anilazinu probíhá nejlépe v kyselém prostředí, neboť první krok této redukce je protonizace triazinového kruhu, bylo pracováno při $\text{pH} = 2$, které bylo zajištěno Britton-Robinsonovým pufrům. V tomto prostředí poskytoval anilazin jediný pík, jehož potenciál byl $E_p = -827 \text{ mV}$ oproti argenchloridové elektrodě. Pík anilazinu byl ve složitějších maticích částečně překryt rozkladem základního elektrolytu, což se projevilo zejména při vyhodnocování křivek o nižších koncentracích. Dále bylo zjištěno, že při kontinuální sérii analýz docházelo k poklesu signálu, proto byla před každé měření zařazena elektrochemická regenerace pracovní elektrody. Ta probíhala střídavým vkládáním vhodných potenciálů na pracovní elektrodu; nalezené optimální potenciály regenerace byly $E_{\text{in}} = -1100 \text{ mV}$ a $E_{\text{fin}} = +50 \text{ mV}$.

Za těchto podmínek byly proměřeny koncentrační závislosti anilazinu v deionizované, vodovodní a říční vodě. Bylo dosaženo následujících limitů stanovitelnosti:

Limity detekce anilazinu získané metodou DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufru ($\text{pH} = 2$) s obsahem methanolu 10 % (V/V)

Matrice	Limit stanovitelnosti
	$L_Q, \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
Deionizovaná voda	0,61
Říční voda	3,20

Dále byla v práci ověřována možnost snížení limitů detekce pomocí AdSV a SPE. Pro AdSV byly použity stejné podmínky jako pro DPV, navíc byla před samotnou analýzou zařazena akumulace látky na pracovní elektrodu. Zvolené parametry adsorpce byly potenciál $E_{\text{acc}} = -100 \text{ mV}$, doba adsorpce $t_{\text{acc}} = 60 \text{ s}$. Za těchto podmínek bylo dosaženo limitu detekce $\text{LOD}_{\text{AdSV}} = 0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Prekoncentrace na tuhé fázi byla optimalizována s využitím 200mg kolonek s reverzní fází Lichrolut RP-18 pro modelové vzorky říční vody o objemu 100 ml. Eluce byla prováděna 1 ml methanolu, který byl doplněn BR pufrům o $\text{pH} 2$ na

10 ml. V takto připraveném roztoku byly změřeny voltametrické křivky pomocí DPV. Limit detekce při zařazení SPE byl $\text{LOD}_{\text{SPE}} = 0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Zařazení prekoncentračních technik pomáhá snížit limit stanovitelnosti. Pro stanovení anilazinu je možné použít jak AdSV, tak SPE, přičemž pomocí SPE lze dosáhnout lepších výsledků než pomocí AdSV. Další možností je zkombinovat obě metody a eluáty z SPE stanovit pomocí AdSV.

6 Seznam použité literatury

-
- ¹ Martin, H.; Worthing, C.R. *Pesticide Manual*, 4th ed.; British Crop Protection Council: Worcestershire, 1974.
- ² Loosli, R. Triazines. *Toxicology* **1994**, 91 (1), 59–62.
- ³ Cremlyn, R. *Pesticides – Preparation and Mode of Action*; John Wiley and Sons: Chichester, 1985.
- ⁴ Copping, L.G; Hewitt, H.G. *Chemistry and mode of action of crop protection agents*; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 1998.
- ⁵ Gilchrist, T.L. *Heterocyclic Chemistry*; Pitman: Londýn, 1985.
- ⁶ Giacomelli, G.; Porcheddu, A. 1,3,5-Triazines. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry III*; Elsevier Ltd.: Sassari, 2008; Chapter 9.03.
- ⁷ Kane, P.; Gail Gillespie, K. Determination of Dyrene and Cyanuric Chloride in Technical Materials. *Agricultural and food chemistry* **1960**, 8 (1), 29–32.
- ⁸ Sabik, H.; Jeannot, R.; Rondeau, B. Review. Multiresidue methods using solid-phase extraction techniques for monitoring priority pesticides, including triazines and degradation products, in ground and surface waters. *Journal of chromatography A* **2000**, 885 (1-2), 217–236.
- ⁹ Dean, J. R.; Wade, G.; Barnabas, I. J. Review. Determination of triazine herbicides in environmental samples. *Journal of chromatography A* **1996** 733 (1-2), 295-335.
- ¹⁰ *Pesticide residues in food: 1989 evaluations Part II Toxicology*; International Programme on Chemical Safety 1989. str. 786
<http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v89pr02.htm> (citováno 18. dubna 2012).
- ¹¹ Reigart, J.; Roberts, J. *Recognition and management of pesticide poisonings*, 5th ed. [online]; EPA: Office of Pesticide Programs: Washington, 1999 str. 152. (citováno 18. dubna 2012).
- ¹² Pesticide Management Education Program. Anilazine (Dyrene) Chemical Fact Sheet 12/83, Cornell University: Ithaca, NY, 1983.
<http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/fung-nemat/acetacid-etridiazole/anilazine/fung-prof-anilazine.html> (citováno 18. dubna 2012)

-
- ¹³ Vyhledávání v registru přípravků. Registr přípravků na ochranu rostlin. Státní rostlinolékařská správa.
<http://eagri.cz/public/app/eagriapp/POR/Vyhledavani.aspx> (citováno 18. dubna 2012).
- ¹⁴ Směrnice Evropské rady 91/414/EHS a nařízení komise (ES) č. 2076/2002.
- ¹⁵ Příloha č. 1 nařízení vlády č. 25/1999 Sb.: Seznam dosud klasifikovaných nebezpečných chemických látek.
- ¹⁶ Pesticide residues MRLs. Nařízení komise (ES) 396/2005
http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm (citováno 18. dubna 2012)
- ¹⁷ Nařízení komise (ES) č. 149/2008
- ¹⁸ Okno do zahrady. <http://www.marigreen.cz/oknodozahrady/travnik.php?od=160>
(citováno 18. dubna 2012)
- ¹⁹ Pesticide info: Anilazine, 2004. Pesticide wise, British Columbia Ministry of Agriculture. <http://www.agf.gov.bc.ca/pesticides/infosheets/anilazine.pdf>
(citováno 18. dubna 2012).
- ²⁰ Gleason, M. Cancellation of Dyrene Fungicide. *Horticulture and Home Pest News* [Online] **1992**, 10, 76–76. (citováno 18. dubna 2012)
- ²¹ Davidson, M. Molecular expressions: The Pesticide Collection, 2004. Optical Microscopy Division of the National High Magnetic Field Laboratory, The Florida State University. <http://micro.magnet.fsu.edu/pesticides/pages/anilazine.html>
(citováno 18. dubna 2012).
- ²² Davidson, M. Molecular expressions: The Pesticide Collection, 2004. Optical Microscopy Division of the National High Magnetic Field Laboratory, The Florida State University. <http://micro.magnet.fsu.edu/pesticides/pages/anilazine.html>
(citováno 18. dubna 2012).
- ²² Plíseň sněžná. Agromanuál.
<http://www.agromanual.cz/cz/atlas/choroby/choroba/plisen-snezna.html> (citováno 18. dubna 2012).
- ²³ Morton, V.; Staub, T. A Short History of Fungicides. *APSnet Features* [Online] **2008**, 10 (3). (citováno 18. dubna 2012)
- ²⁴ Stevens – White, R. (Edit.) *Pesticides in the environment* 1st ed.; Dekker: New York, 1971.

-
- ²⁵ Lavorenti, A.; Burauel, P.; Wais, A.; Führ, F. Remobilization of bound anilazine residues in fulvic acids. *Pesticidas: R. Ecotoxicol e Meio Ambiente* **1998**, 8, 33–44.
- ²⁶ Klaus, U.; Mohamed, S.; Volk, M.; Spiteller, M. Interaction of aquatic humic substances with anilazine and its derivatives: The nature of the bound residues. *Chemosphere* **1998**, 37 (2), 341–361.
- ²⁷ Chiou, C. T.; Malcolm, R. L.; Brinton, T. I.; Kile, D. E. Water solubility enhancement of some organic pollutants and pesticides by dissolved humic and fulvic acids, *Environ. Sci. Technol* **1986**, 20 (5), 502-508.
- ²⁸ Barceló, D.; Hennion, M.-C. Trace Determination of Pesticides and Their Degradation Products in Water, 2nd. Ed. Elsevier Science B. V.: Amsterdam 1997. [online] (citováno 8. dubna 2012)
- ²⁹ Anilazine. GESTIS Substance Database. [http://gestis-en.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_en/490129.xml?f=templates\\$fn=default.htm\\$3.0](http://gestis-en.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_en/490129.xml?f=templates$fn=default.htm$3.0) (citováno 18. dubna 2012).
- ³⁰ Tomlin, C. D. S., Ed. *The Pesticide Manual - World Compendium*, 10th ed. [online]; The British Crop Protection Council: Surrey, UK, 1994; p 43. (citováno 3. dubna. 2012)
- ³¹ Zenz, C.; Dickerson, O. B.; Horvath, E. P. *Occupational medicine*, 3rd ed.; Mosby Inc.: St. Louis, MO, 1994.
- ³² Gosselin, R. E.; Smith, R. P.; Hodge, H. C. *Clinical Toxicology of Commercial Products*, 5th ed.; Williams and Wilkins: Baltimore, 1984.
- ³³ Integrovaná prevence a omezování znečištění. Referenční dokument o ekonomii a mezisložkových vlivech, 2005. Enviroportál.sk. <http://ipkz.enviroportal.sk/bat-download.php?id=18> (citováno 18. dubna 2012).
- ³⁴ Agricultural Research Service. *USDA Information Memorandum* **1966**, 20.
- ³⁵ Mayer Jr., F. L.; Ellersieck, M. R. *Manual of Acute Toxicity*; Office of Pesticide Programs 2000. Pesticide Ecotoxicity Database: Washington D.C., 1986.
- ³⁶ Lewalter, J.; Leng, G. Consideration of individual susceptibility in adverse pesticide effects. *Toxicology Letters* **1999**, 107 (1-3), 131–144.
- ³⁷ Meagher, W. R.; Anderson, C.A.; Ellen Gonter, C.; Smith, S.B.; MacDougall, D. Colorimetric method for the determination of dyrene residues in plant material. *J. Agric. Food Chem.* **1959**, 7 (8), 558–560.

-
- ³⁸ Barry, D. L.; Lisk, D. J. Determination of dyrene in apples by application of the Zincke reaction. *J. Agric. Food Chem.* **1959**, 7 (8), 560–561.
- ³⁹ Trautwein, N. L.; Guyon, J. C. Determination of the pesticides alachlor, anilazine, bromoxynil and dichlobenil by low temperature phosphorimetry. *Analytical letters* **1983**, 16 (A13), 969 – 977.
- ⁴⁰ Stoytcheva, M., Ed. *Pesticides in the Modern World - Trends in Pesticides Analysis*, 1st ed.; InTech: Rijeka, 2011.
- ⁴¹ Rodríguez-Plasencia, F.J.; Navarro-Villoslada, F.; Pérez-Arribas, L.V.; León-González, M.E.; Polo-Díez, L.M. Short communication. Preconcentration of triazine herbicides from water by an ion chromatography column and determination by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography A* **1997**, 760 (2), 314–318.
- ⁴² Sherma, J. Chromatographic analysis of fungicides. *Journal of chromatography A* **1975**, 113 (1), 97–137.
- ⁴³ Volmer, D.; Levsen, K.; Wünsch, G. Thermospray liquid chromatographic-mass spectrometric multi-residue determination of 128 polar pesticides in aqueous environmental samples. *Journal of chromatography A* **1994**, 660 (1-2), 231–248.
- ⁴⁴ Bernal, J. L.; del Nozal, M. J.; Martín, M. T.; Jimenéz, J. J. Possibilities of gas chromatography-atomic emission detection in pesticide multiresidue analysis; application to herbicide analysis in soils. *Journal of chromatography A* **1996** 754 (1-2), 245-256.
- ⁴⁵ Stan, H.-J.; Linkerhängner, M. Pesticide residue analysis in foodstuffs applying capillary gas chromatography with atomic emission detection State-of-the-art use of modified multimethod S19 of the Deutsche Forschungsgemeinschaft and automated large-volume injection with programmed-temperature vaporization and solvent venting. *Journal of chromatography A* **1996**, 750 (1), 369–390
- ⁴⁶ Sherma, J.; Zweig, G. Pesticides. *Anal. Chem.* **1983** 55, 57R–70R.
- ⁴⁷ Gelsomino, A.; Petrovičová, B.; Tiburtini, S.; Magnani, E. Multiresidue analysis of pesticides in fruits and vegetables by gel permeation chromatography followed by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometric detection. *Journal of chromatography A* **1997** 782 (1-2), 105-122.

-
- ⁴⁸ Zuman, P.; Privman, M.; Shibata, M.; Ludvík J. Electroreduction of some diazine and triazine pesticides at the dropping mercury electrode. *Turkisch journal of chemistry* **2000** 24, 311–331.
- ⁴⁹ Garrido, E. M.; Delerue-Matos, C.; Lima, J. L. F. C.; Brett, A. M. O. Electrochemical methods in pesticides control. *Analytical letters* **2004**, 37 (9), 1755-1791.
- ⁵⁰ Higuera, M. J.; Ruiz Montoya, M.; Rodriguez Mellado, J. M. On the electroreduction of 4-chloro-2,6-diisopropylamino-s-triazine (propazine) on mercury electrodes. *Electrochemistry Communication* **1999**, 1, (184 – 189).
- ⁵¹ Higuera, M.J.; Marín Galvín, M.; Rodríguez Mellado, J.M.; Ruiz Montoya, M. EC(EE) processes in the reduction of some 2-methylthio-4,6-di(alkylamino)-1,3,5-triazines on mercury electrodes. *Electrochemistry communications* **2002** 4, 30–35.
- ⁵² Ignjatović, L. M.; Marković, D. A.; Veselinović, D. S.; Bešić, B. R. Polarographic behavior and determination of some s-triazine herbicides. *Electroanalysis* **1993** 5, 529–533.
- ⁵³ Barek, J.; Fogg, A.G.; Moreira, J. C.; Valnice B. Zanoni, M.; Zima, J. Polarographic and voltammetric determination of selected triazine-based azo dyes with different reactive groups. *Analytical chimica acta* **1996** 320, 31–42.
- ⁵⁴ Skopalová, J.; Kotouček, M. Polarographic behaviour of some s-triazine herbicides and their determination by adsorptive stripping voltammetry at the hanging mercury drop electrode. *Fresenius'journal of analytical chemistry* **1995** 351, 650–651.
- ⁵⁵ Owens, D. S.; Sturrock, P. E. Determination of triazine pesticides by high-performance liquid chromatography with sept potential electrochemical detection *Analytica chimica acta* **1986**, 188, 269–247.
- ⁵⁶ Pacáková, V.; Němec, I. Gas chromaotgraphic, spectrophotometric and electrochemical behavior of substituted s-triazines. *Journal of chromatography A* **1978**, 148 (1) 273
- ⁵⁷ Mercan, H.; Inam R. Determination of the fungicide anilazine in the soil and river water by differential pulse polarography. *Clean* **2008**, 36 (10 – 11), 913 – 919.
- ⁵⁸ Štulík, K.; Barek, J. Elektrochemické analytické metody 1. vydání, Univerzita Karlova v Praze: Praha 1985.

-
- ⁵⁹ Vyskočil, V.; Barek, J. Mercury electrodes – possibilities and limitations in environmental analysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **2009** 39 (3), 173–188.
- ⁶⁰ Yosypchuk, B. Pevné amalgámové elektrody a jejich využití v analýze biologicky aktivních sloučenin. In *Možnosti inovací v analytické chemii*. Pražské analytické centrum inovací: Praha, 2006.
- ⁶¹ Novotný, L.; Yosypchuk, B. Pevné stříbrné amalgamové elektrody. *Chemické listy* **2000** 94, 1118–1120.
- ⁶² Vaňková, L.; Maixnerová, L.; Čížek, K.; Fischer, J.; Barek, J.; Navrátil, T.; Yosypchuk, B. Voltametrické stanovení submikromolárních koncentrací 3-nitrofluoranthenu a pendimethalinu na stříbrné pevné amalgámové elektrodě. *Chemické listy* **2006** (100), 1–8.
- ⁶³ Cabalková, D.; Barek, J.; Fischer, J.; Navrátil, T.; Pecková, K.; Yosypchuk, B. Voltametrické stanovení herbicidu bifenoxu na stříbrné pevné amalgámové elektrodě modifikované rtuťovým meniskem. *Chemické listy* **2009** 103, 236–242.
- ⁶⁴ Dodova, E.; Barek, J.; Navrátil, T.; Yosypchuk, B.; Novotný, L.; Zima, J. Voltammetric determination of N, N-Dimethyl-4-Amino-2'-Carboxyazobenzene at a Silver Solid Amalgam Electrode. *Electroanalysis* **2003** 15 (22), 1778–1781.
- ⁶⁵ Jiránek, I.; Pecková, K.; Králová, Z.; Moreira, J. C.; Barek, J. The use of silver solid amalgam electrode for voltammetric and amperometric determination of nitroquinolines. *Electrochimica acta* **2009** 54, 1939–1947.